

**CENTRO NACIONAL DE SANIDAD AGROPECUARIA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

***Neospora caninum* ASOCIADO CON ALGUNOS AGENTES PATÓGENOS
VINCULADOS AL ABORTO EN VACAS LECHERAS DEL ESTADO DE
HIDALGO, MÉXICO.**

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Autor: YOLANDA MARGARITA SÁNCHEZ CASTILLEJA

Tutor: Dra. C. Miriam Pedroso Reyes
Dr. Cs. Jesús Rodríguez Diego

La Habana

2012

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana, por las grandes facilidades para la realización de estudios de doctorado.

Al Dr. Salvador Vega y León, Rector de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, por su apoyo para lograr mis objetivos.

A la Dra. C. Lidia Tablada, Directora del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, por su gran respaldo e interés.

A los tutores Dra. C. Miriam Pedroso y Dr. Cs. Jesús Rodríguez Diego por su confianza y apoyo para lograr mis objetivos.

A la Dra. C. Sandra Cuello, por sus valiosos consejos más que orientadores.

A mis compañeros y amigos, Yolanda Gutiérrez, Héctor Herrera y Luis Mario Madrid por su ayuda constante e incondicional.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por su presencia en cada paso que doy.

A mi hija María Fernanda por SER y demostrarme lo que es amar. Eres la razón de mi vida.

A Yolanda y Alfredo quienes son los mejores padres del universo.

A mis hermanos Silvia, Alfredo, Pepe y sus adorables hijos José Manuel, Átzin e Isabella por su gran cariño y apoyo.

A mi tía Marisela por su presencia y auxilio constante.

A mis muy queridos abuelos María† y Mario† a los que recordaré con el más profundo amor.

SÍNTESIS

El objetivo de este trabajo fue determinar la asociación serológica de *Neospora caninum* con *Brucella abortus* y los virus de la Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (RIB) vinculados al aborto, en el ganado bovino lechero de Hidalgo, México. Para ello, se recuperaron 35 fetos bovinos abortados para análisis histopatológicos y PCR tiempo real (tr), y, se extrajeron un total de 500 muestras sanguíneas de hembras bovinas lecheras, para el diagnóstico por la técnica inmunoenzimática. Los resultados histopatológicos y de PCRtr mostraron lesiones microscópicas indicativas de infección parasitaria cerebral por *Neospora caninum* en un 40%, donde primaron tres estructuras (8.57%) compatibles con quistes tisulares asociados a focos de necrosis (25.71%), además, 5 de 10 de estas muestras fueron positivas a la PCRtr. La serologías revelaron presencia simultánea de anticuerpos contra el protozoo y *Brucella abortus* en un 21.2%, 33.6% con DVB y 30.6% con RIB. Se evidenció un 26.2% de animales positivos a *N. caninum* con antecedentes de aborto, los cuales presentaron mayor riesgo de aborto (Odds ratio 4.16) en las gestaciones subsiguientes, esta cifra se incrementó (Odds ratio 5) al asociar el número de vacas seropositivas a DVB. La vinculación serológica del parásito con RIB y *Brucella abortus* en vacas que presentaron aborto mostraron valores de 17.82 y 26.74% respectivamente.

INDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	2
2. HIPÓTESIS	5
3. OBJETIVOS	7
3.1 Objetivo general	7
3.2 Objetivos particulares	7
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
4.1 Antecedentes de <i>Neospora caninum</i>	9
4.2 Distribución de <i>Neospora caninum</i>	10
4.3 Distribución de <i>Neospora caninum</i> en México	11
4.4 Características de <i>Neospora caninum</i>	12
4.5 Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	15
4.6 Transmisión de <i>Neospora caninum</i>	17
4.7 Signos clínicos de <i>Neospora caninum</i>	20
4.8 <i>Neospora caninum</i> : características antigénicas y comportamiento ante la respuesta defensiva del hospedero	21
4.9 Diagnóstico de <i>Neospora caninum</i>	26
4.9.1 Exámenes generales macroscópicos	26
4.9.1.1 Examen clínico	26

4.9.1.2 Lesiones macroscópicas en placenta y fetos .	26
4.9.2 <i>Métodos directos</i>	27
4.9.2.1 Histopatología	27
4.9.2.2 Inmunohistoquímica	29
4.9.2.3 Cultivo de taquizoitos	29
4.9.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .	29
4.9.2.5 Microscopía electrónica	30
4.9.3 <i>Métodos indirectos</i>	30
4.9.3.1 Inmunofluorescencia indirecta	30
4.9.3.2 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA)	31
4.10 Diagnóstico diferencial de <i>Neospora caninum</i>	31
4.10.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	32
4.10.2 Brucelosis	33
4.10.3 Diarrea Viral Bovina (DVB)	35
4.10.4 Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB)	36
4.11 Control de <i>Neospora caninum</i>	36
4.12 Vacuna de <i>Neospora caninum</i>	38
5. PARTE EXPERIMENTAL	41
5.1 Experimento 1	41

Resultados y discusión	45
5.2 Experimento 2	56
Resultados y discusión	59
5.3 Experimento 3	74
Resultados y discusión	78
6. CONCLUSIONES GENERALES	82
7. RECOMENDACIONES	84
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
9. ANEXOS	105

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Interpretación de los resultados para los sistemas de detección de patógenos con 2 fluoróforos	45
Tabla 2. Interpretación de resultados a PCRtr	45
Tabla 3. Lesiones identificadas en cerebros de fetos bovinos coincidentes con <i>Neospora caninum</i> por medio de métodos histopatológicos	46
Tabla 4. Resultados de lecturas espectrofotométricas y determinación del grado de pureza	52
Tabla 5. Seropositividad a <i>Neospora caninum</i> , <i>Brucella abortus</i> , RIB y DVB en establos lecheros pertenecientes al Edo. de Hgo., México	63
Tabla 6. Asociación serológica de <i>N. caninum</i> con otros agentes infecciosos en 500 vacas lecheras pertenecientes a Hgo., México	66
Tabla 7. Número de animales seropositivos a <i>Neospora caninum</i> , <i>Brucella abortus</i> , RIB y DVB en relación al aborto	71
Tabla 8. Interrelación de animales seropositivos a <i>Neospora caninum</i> , <i>Brucella abortus</i> , DVB y RIB en relación al aborto	72
Tabla 9. Datos para estimar pérdidas económicas por <i>N. caninum</i> en el ganado bovino lechero de Hgo. México	76
Tabla 10. Hoja de cálculo para estimar pérdidas económicas directas por <i>N. caninum</i> en el ganado bovino lechero de Hgo. México	77
Tabla 11. Pérdidas económicas directas por <i>N. caninum</i> en el ganado bovino lechero de Hgo. México	79

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1 Focos de necrosis y presencia de células gliales (40X)	47
Fig. 2 Corte histopatológico de cerebro de feto bovino que presenta vasos sanguíneos inflamados. (40X).....	48
Fig. 3 Presencia de células mononucleares en tejido cerebral de fetos bovinos (100X)	49
Fig. 4 Presencia de células mononucleares y estructura coincidente con quiste de <i>Neospora caninum</i> en fetos bovinos. (100X)	50
Fig. 5 Presencia de ADN en muestras de cerebro de fetos bovinos abortados gel de agarosa al 1%	51
Fig. 6 Resultados obtenidos en las muestras 2 y 3 de cerebro fetal bovino mediante el fluoróforo FAM	53
Fig. 7 Resultados obtenidos en las muestras 2 y 3 de cerebro fetal bovino mediante el fluoróforo VIC	53
Fig. 8 Resultados obtenidos en las muestras 4, 5 y 6 de cerebro fetal bovino mediante el fluoróforo FAM	54
Fig. 9 Resultados obtenidos en las muestras 4, 5 y 6 de cerebro fetal bovino mediante el fluoróforo VIC	54

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El protozoo parásito *Neospora caninum*, del cual se desconoce aún el ciclo de vida completo, se identificó inicialmente como *Toxoplasma gondii*, por la presencia de lesiones microscópicas en el sistema nervioso central y músculos de perros, comparables a este; sin embargo, las serologías negativas condujeron a otras investigaciones en las que se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas y microscopía electrónica que permitieron más tarde el aislamiento de un nuevo parásito, “*Neospora caninum*” (Dubey et al., 1988^a). Posteriormente, se reconoció su participación en eventos abortivos principalmente en ganado bovino productor de leche (Innes et al., 2005; Maley et al., 2006; Gibney et al., 2008), con pérdidas en la producción, reproducción (Dubey et al., 2007) y finalmente económicas estimadas en millones de dólares anuales (Anderson et al., 1991; Anderson et al., 2000; Brittain, 2000; Weersink et al., 2002).

En bovinos, la ruta de transmisión del parásito mejor descrita es la vía transplacentaria la cual se considera la forma más importante para mantener la infección en los hatos debido a la eliminación del parásito a través de los fetos abortados o por el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Anderson et al., 2000; Vázquez et al., 2008) que pueden morir entre los 90 y 180 días

postparto, presentar sintomatología nerviosa o pueden ser portadores de tipo asintomático (*Hietala y Thurmond, 1999; Maley et al., 2003*). La transmisión horizontal no se descarta al demostrarse la presencia de ooquistes en materia fecal de caninos alimentados con tejidos infectados (*McAllister et al., 1998*).

La neosporosis bovina se asocia particularmente al virus de la diarrea viral bovina (DVB) (*Björkman et al., 2000; McAllister y Latham, 2002; Muñoz-Zanzil et al., 2003*), el cual actúa como inmunosupresor favoreciendo la implantación de *N. caninum* y desencadenando el proceso abortivo (*Tizard, 2002; Muñoz-Zanzil et al., 2003*). Existen pocos datos que indiquen asociación con otros agentes infecciosos que tienen gran importancia desde el punto de vista de la etiología del aborto como el herpesvirus bovino 1 (HVB-1) agente causal de la rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB) (*Babiuk et al., 1996*) y la bacteria *Brucella abortus*, ampliamente distribuidos en la población bovina (*Moreno, 2002; www.senasica.gob.mx 14 de marzo del 2012*).

En México, se demuestra la presencia del parásito en fetos bovinos lecheros en el año 1997 (*Morales et al., 2001^a; Morales et al., 2001^b*), y más recientemente se reportan elevadas seropositividades en ganado bovino lechero y de carne en algunos estados del país, como Aguascalientes, Durango, Querétaro, Yucatán, Chiapas e Hidalgo (*García-Vázquez et al., 2009; Romero-Salas et al., 2010*); sin embargo, la información epidemiológica respecto al parásito y su vínculo con la

presencia del aborto es reducida así como inexistente la que concierne a otros agentes coinfectantes.

Esto, principalmente debido a que en México la búsqueda etiológica generalmente se orienta a los agentes que históricamente trascienden en las explotaciones o que representan un riesgo para la salud pública, como la *Brucella abortus* (SAGARPA, 1997). De esta manera, los expertos en salud animal debieran percatarse que cada día se notifican nuevos microorganismos capaces de causar grandes trastornos dentro del hato, pero que por desconocimiento no se les toma en consideración

Por lo anteriormente planteado, es necesario investigar la participación e impacto del parásito en los sistemas de explotación bovina, así como la simultaneidad serológica con otros agentes no sólo para reducir los problemas productivos y reproductivos, sino porque al no disponer de herramientas para el tratamiento, su diagnóstico tiene validez, ya que se puede evitar la toma de acciones de control (como las vacunaciones) sobre enfermedades no prevalentes, lo que incrementa aún más los costos en los sistemas de producción.

A partir de lo señalado, planteamos la siguiente hipótesis de trabajo

2. HIPÓTESIS

Neospora caninum se asocia serológicamente a algunos agentes bacterianos y virales en los casos de aborto bovino en la zona de Hidalgo, México.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la asociación serológica de *N. caninum* con *B. abortus* y los virus de la diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina vinculados al aborto, en el ganado bovino lechero de Hidalgo, México.

3.2 Objetivos particulares

- Identificar lesiones histológicas coincidentes con *N. caninum* y presencia de ADN en tejido cerebral de fetos bovinos.
- Asociar serológicamente *N. caninum* con *B. abortus* y los virus de la diarrea viral bovina y rinotraqueítis infecciosa bovina, en casos de aborto, en ganado bovino lechero de Hidalgo, México.
- Cuantificar las pérdidas económicas, sobre la base de la probabilidad de aborto por *N. caninum* en ganado bovino lechero de Hidalgo, México.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Antecedentes de *Neospora caninum*

El primer antecedente de la existencia del agente lo constituye la notificación de Bjerkas *et al.*, (1984) quienes encontraron lesiones microscópicas en sistema nervioso central y músculos de perros, comparables a aquellas causadas por las formas parasitarias de la familia *Sarcocystidae*. Más tarde, se registraron otros casos similares de perros con encefalitis congénita que resultaron negativos serológicamente a *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), por lo que utilizaron técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) y microscopía electrónica que permitieron la identificación de un parásito que se nombró *Neospora caninum* (*N. caninum*) y la enfermedad relativa neosporosis (Dubey *et al.*, 1988^a). Poco después se demostró la participación del protozoo como causa de aborto en el ganado productor de leche y carne (Thilsted y Dubey, 1989), y se define al perro como hospedero definitivo al demostrar la presencia de ooquistes en materia fecal de animales alimentados con tejidos bovinos infectados (McAllister *et al.*, 1998).

4.2 Distribución de *Neospora caninum*

Se notifica en muchos países, de todos los continentes. En Egipto, se obtuvo un 20.43% de animales positivos al parásito (*Ibrahim et al., 2009*), y en Irán de 46% a 78 % (*Razmi et al., 2006; Ansari-Lari et al., 2011*).

Se considera de carácter emergente en Corea (*Son et al., 2011*) Japón (*Koiwai et al., 2006*), China (*Xia et al., 2011*), inclusive en Australia y Nueva Zelanda se estiman gastos anuales por 100 millones de dólares por esta causa (*Reichel, 2000; Pfeiffer et al., 2002*). En Italia, Otranto *et al., (2002)* reportaron 11% de seropositividad, con mayor frecuencia en el norte del país; en España y Suecia se registran prevalencias de 16.2 y 0.5% respectivamente (*Bertels et al., 2006*), Inglaterra señaló 6% generándose aproximadamente 6000 abortos anuales, con mermas calculadas en 4.8 millones de dólares (*Brittain, 2000*).

También se reporta en Argentina (*Moore et al., 2008*), Paraguay (*Osawa et al., 2002*), Uruguay (*Furtado et al., 2011*), Venezuela (*Lista-Alves et al., 2006*), Brasil (*Corbellini et al., 2002*), Canadá (*Chi et al., 2002*) y en EU, específicamente en el estado de California, donde se considera endémico, con prevalencias del 33% en hatos lecheros y con pérdidas de hasta 35 millones de dólares (*Anderson et al., 1991; Anderson et al., 2000*).

Así, se demuestra su presencia, mayoritariamente en unidades de producción de leche estabuladas, donde el manejo de población, principalmente en cuanto a las medidas higiénicas, favorece su diseminación, independientemente de la posible participación del comercio internacional y nacional (*Anderson et al., 2000; Dubey et al., 2007; Eiras et al., 2011; Nasir et al., 2011 in press*).

4.3 Distribución de *Neospora caninum* en México

En México, se demostró la presencia del parásito en 1997 al identificarse lesiones microscópicas consistentes con neosporosis en fetos bovinos lecheros (*Morales et al., 2001^a; Morales et al., 2001^b*), lo que coincide con trabajos realizados por *García-Vázquez et al., (2002, 2005)* quienes además reportan seroprevalencias que llegan incluso al 75% y a cerca del 100% de los hatos en las principales cuencas lecheras del país (Chihuahua, Durango, Coahuila, Aguascalientes, Querétaro, Hidalgo y Jalisco) y en los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Chiapas, Veracruz y Yucatán donde el ganado que abunda es el de carne con cifras de 11.6 a 45% (*Salinas et al., 2005; García-Vázquez et al., 2009; Romero-Salas et al., 2010*).

Trabajos en el estado de Aguascalientes logran definir como factores de riesgo, la contaminación del agua de bebida con ooquistes, presencia de aves domésticas, las cuales, actualmente se asocian a la neosporosis y la

contaminación del alimento con micotoxinas, por su participación en procesos inmunosupresores (*Martins et al., 2011; Conzuelo et al., 2011*).

Así mismo, se describe en el Altiplano Mexicano el hallazgo de lesiones características a *N. caninum*, en 68 fetos de 182 estudiados (37.36%) mediante técnicas histopatológicas e inmunohistoquímicas; sin embargo las cifras datan del año 1997 (*Morales et al., 1997*). Estudios posteriores en el centro y norte del país reportan porcentajes cercanos a 26% en animales con antecedentes de aborto, por lo que se considera de carácter endémico (*García-Vázquez et al., 2005; Medina et al., 2006*).

4.4 Características de *Neospora caninum*

N. caninum es un protozoario intracelular obligado que pertenece al subreino *Protozoa*, phylum *Apicomplexa*, familia *Sarcocystidae* (*Hemphill et al., 1999; Moore et al., 2005*) donde están agrupados también los géneros *Toxoplasma* y *Sarcocystis*, pero que difieren por los hospederos que utilizan en su ciclo de vida, las enfermedades que producen, pero ante todo por su estructura, lo que determina su clasificación en diferentes géneros y especies (*Dubey et al., 1988^a*).

Otros estudios concluyen que *N. caninum* está filogenéticamente más próximo a *Hammondia heydorni* (*Mehlhorn y Heydorn, 2000; Heydorn y Mehlhorn, 2002^a; Heydorn y Mehlhorn, 2002^b*); sin embargo, *Dubey et al., (2002)* encontraron diferencias no sólo

biológicas, inmunológicas y morfológicas sino también moleculares entre estos dos parásitos.

Se conocen tres estadios parasitarios de *N. caninum*: taquizoitos y quistes tisulares (fases asexuales) encontrados en hospedadores intermediarios y los ooquistes. Las dos primeras constituyen las formas intracelulares, en tanto, la tercera es eliminada en las heces del perro.

- Los **taquizoitos** tienen forma ovalada, media luna o globular y miden de 3 a 7 μm de largo por 1 a 5 μm de ancho, lo que depende del estadio de división, tienen un plasmalema y una membrana interna, un complejo apical formado por 22 microtúbulos subpeliculares. Presenta de una a tres mitocondrias, núcleo, nucleolo, aparato de Golgi, ribosomas, polisomas, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplásmico liso y rugoso y un poro posterior. Además, dos anillos apicales, un microporo inactivo, un conoide, un anillo polar, cerca de 150 micronemas, y entre 8 y 12 roptrias, localizados posterior al núcleo, se reconocen asimismo organelos capaces de favorecer la invasión e interacción con el huésped (*Lindsay et al., 1993; Sonda et al., 2000; Dubey et al., 2002*).

Este estadio se encuentra generalmente a nivel citoplasmático, con o sin formación de la vacuola parasitófaga de la célula hospedadora como los

macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales, células renales, miocitos, neuronas y hepatocitos, donde proliferan por endodiogénesis, lo que produce cientos de nuevos parásitos en pocos días (*Dion et al., 2011*). Los taquizoitos proliferantes pueden agruparse y formar un pseudoquiste ligado a la membrana y conforme este quiste gana masa, la célula hospedero se lisa, con lo que se liberan los taquizoitos que subsecuentemente infectaran a las células vecinas y que pueden además ser transmitidos transplacentariamente al feto de los animales preñados, lo que se puede relacionar con las lesiones microscópicas (*Dubey, 2003*).

- Los **quistes tisulares** son redondos u ovales, miden hasta 107 μm ; estos tienen una pared gruesa de 1 a 4 μm , en cuyo interior se sitúan de 50 a 500 bradizoitios, considerados estadios parasitarios de lenta replicación (*Jardine, 1996*). Por otra parte, el número de roptrias es menor que en los taquizoitos y tienen más gránulos de amilopectina. Se les localiza principalmente en tejido neural y muscular fetal de los hospederos intermediarios (*Dubey y Lindsay, 1996*).
- Los **ooquistes o quistes esporulados** son esféricos o subesféricos, miden de 10-11 μm y contienen dos esporocistos con cuatro esporozoitos cada uno (*Dubey et al., 2002*).

4.5 Ciclo biológico de *Neospora caninum*

Aunque se desconoce hasta la fecha la fase enteroepitelial del parásito y en general el ciclo de vida completo de la *Neospora*, se plantea, por su similitud con *Toxoplasma gondii*, que puede iniciar cuando el perro (*Canis familiaris*) ingiere fetos, placenta o carne de animales e inclusive calostro o leche de origen bovino que contienen quistes (bradizoitos) (Dijkstra et al., 2002; Gondim et al., 2002).

La pared del quiste probablemente sea disuelta por los jugos gástricos del hospedero definitivo, de manera que se liberan las formas parasitarias, es decir, los bradizoitos, que iniciarían los estados de multiplicación enteroepitelial (endodiogenia-fase asexual), dando paso posteriormente a la fase sexual gametogónica y esporogónica en los enterocitos con la formación de 2 gametos, ellos son, el microgametocito y el macrogametocito. El primero se reproduce intracelularmente hasta romper la célula hospedero y liberar los microgametos que penetrarán en el macrogameto (producto de la maduración del macrogametocito), finalmente se forma el cigoto que evoluciona y sale de la célula para formar un ooquiste (Gondim et al., 2004).

Ese estadio puede permanecer en la luz intestinal en su forma inmadura, hasta que al madurar, rompe la célula intestinal para ser expulsado en las heces hacia el agua y el pasto. A las 24 horas, después de su eliminación, los ooquistes esporulan con la posibilidad de infectar bovinos (Dijkstra et al., 2001; Gondim et al.,

2004), caprinos y aún ciervos y equinos (Marsh et al., 1996; Yagoob, 2012), lo cual suele ocurrir cuando el animal ya consume una dieta mixta (infección exógena) (Uggla et al., 1998; Venturini et al., 1999). Los ooquistes liberan en el intestino esporozoitos, que conduce a la fase rápida de división de taquizoitos dentro de varias células hospederos como los enterocitos (fase proliferativa).

Los taquizoitos se multiplican activamente hasta que la célula hospedero se lisa y los nuevos taquizoitos formados infectan a las células vecinas; es en este punto donde probablemente se cumpla la *fase asexuada* con la formación de bradizoitos que, en dependencia del medio ambiente infectarán otras células o enquistarán, estado que las capacita para permanecer en latencia (Dubey, 2003).

En el período de gestación influencias hormonales e inmunológicas, reactivan y liberan al parásito con la facultad de atravesar la placenta para invadir las células embrionarias o fetales dando paso a procesos de multiplicación mediante endodiogenia, esto, ocasiona necrosis e inflamación en el tejido placentario con la subsecuente expulsión del feto. Los bradizoitos que enquistan como medio de protección ante la respuesta inmune fetal, finalmente pueden ser ingeridos por los caninos cerrando el ciclo epidemiológico (McGarry et al., 2003).

4.6 Transmisión de *Neospora caninum*

La Neosporosis es una enfermedad que se detecta en la mayoría de las especies domésticas como los bovinos, ovinos, caprinos, equinos, aves (*Dubey y Schares, 2011; Martins et al., 2011; Moreno et al., 2012*) y en animales silvestres como ciervos, búfalos de agua, camélidos, rinocerontes, antílopes, mapaches, liebres, zorros dingos, felinos salvajes, roedores e insectos quienes actúan como hospederos intermediarios (*Baldone et al., 2009; Hosseini et al., 2009; Meerburg et al., 2012*).

Los coyotes y perros, principalmente de razas Labrador, Boxer, Greyhound, Golden Retriever y Basset Hound (*Anderson et al., 2000; Buxton et al., 2002; Dubey, 2003*) se identifican como hospederos definitivos (*Gondim et al., 2004; Dubey et al., 2006; Dubey y Schares, 2011*) al demostrarse la presencia de ooquistes en materia fecal de animales alimentados con tejidos infectados de taquizoítos (*McAllister et al., 1998*), aunque Lindsay *et al.*, (2001) asegura que el bajo número de ooquistes en heces caninas es indicio de que probablemente no sea el mejor hospedero definitivo en la naturaleza.

No está claro si el *N. caninum* es un patógeno que afecte al humano, pues estudios en Argentina e Inglaterra aseveran la ausencia del parásito (*McCann et al., 2008; Moore et al., 2008*), pero Tranas *et al.*, (1999) e Ibrahim *et al.*, (2009) reportan evidencia serológica de infección en cerca del 8% de los humanos sujetos a

estudio, inclusive otros demuestran la susceptibilidad a infección de trofoblastos y células cervicales uterinas en la interfase materno-fetal de humanos (*Carvalho et al., 2010*).

Debido a su parentesco con *Toxoplasma gondii*, se propone la transmisión por vía oral (horizontal) a través del consumo de tejidos bovinos o de otros carnívoros infectados, o bien de forrajes contaminados con materia fecal de caninos o de otros carnívoros que actuarían como hospederos definitivos (*Anderson et al., 2000*).

No se observa transmisión entre vacas, y la transmisión venérea del parásito no tiene importancia desde el punto de vista epidemiológico (*Dubey et al., 2006*), aún cuando se demostró la presencia esporádica del ácido desoxirribonucleico (ADN) de *N. caninum* en semen fresco y congelado, pues la carga parasitaria por eyaculado es baja (100 parásitos) con respecto a la necesaria para infectar a la hembra (5,000 a 50,000) (*Ortega-Mora et al., 2003*).

Los reportes de infección por ingestión de calostro o leche de vacas seropositivas se demuestran por la presencia de ADN del protozoo en el calostro de vacas infectadas (*Moskwa et al., 2007*) y el hallazgo de residuos de ADN en cerebros de dos neonatos alimentados a base de leche infectada con taquizoitos de *N. caninum* (*Uggla et al., 1998; Davison et al., 2001*); contradictoriamente *Anderson et al., (1997)* informan que en aquellos que reciben

calostro, los niveles de anticuerpos se vuelven imperceptibles a partir del 6º mes de vida.

Se prueba plenamente la transmisión transplacentaria (endógena/exógena), donde cerca del 80% de las vacas portadoras, con una eficiencia del 95%, puede dar lugar a la contaminación fetal, con las siguientes alternativas (*Dubey et al., 2006, Son et al., 2011*):

- a) Una muerte fetal con el aborto subsecuente.
- b) Nacimiento de un ternero a término con lesiones especialmente nerviosas que muere aproximadamente entre los 90 y 180 días post parto (*Hietala y Thurmond, 1999; Wouda, 2000*).
- c) Más comúnmente se presenta nacimiento de un animal clínicamente normal pero infectado persistentemente que, posteriormente, cuando alcanza la edad reproductiva, puede originar contaminación fetal, observable en vacas con altos niveles de anticuerpos en el último trimestre de gestación (*Williams et al., 2003*). En los terneros infectados congénitamente los altos niveles de anticuerpos post-infecciosos permanecen por más tiempo y a veces no desaparecen (*Anderson et al., 1997*).

4.7 Signos clínicos de *Neospora caninum*

En los casos reportados no se detectan signos previos al aborto, el cual se presenta entre los 3 y 7 meses de gestación, después en un periodo de incubación de 3-4 semanas (*Bidfel et al., 1994; Dubey, 2003*), aunque Wouda (2000) menciona que el aborto puede ser en cualquier etapa de la gestación y sin diferencia en la edad o el número de partos, de manera esporádica (enzoótica) o en forma de brotes (epizoótica) (*Dubey, 2005; Hall et al., 2005*).

Se reporta que vacas que abortaron por primera vez, lo volvieron a hacer, sin definir si la infección se originó de los quistes existentes en ellas o si se debió a una reinfección (*Obendorf et al., 1995*). Corbellini *et al.*, (2006) y Beck *et al.*, (2010) por su parte informan que bovinos infectados con *N. caninum* tienen de 3-5 o hasta 12 veces más probabilidades de abortar que aquellos no infectados, contrastando con los hallazgos de Anderson *et al.*, (2000) e Innes *et al.*, (2001) quienes manifiestan disminución del riesgo de aborto en las gestaciones subsecuentes.

Trabajos estadísticos muestran una gran asociación entre la presencia del parásito y la alteración de los parámetros reproductivos, específicamente en aumento del intervalo parto-concepción, días abiertos, servicio por concepción (*Romero et al., 2005; Medina, 2008*), retenciones placentarias hasta en un 4% (*Thurmond et al., 1997*) y alteración en la fertilidad (*Hartwig, 2000; Simsek et al., 2008*).

Con respecto a la producción de leche, se describen resultados contradictorios, unos aseguran haber obtenido un aumento en la producción en vacas seropositivas (*Pfeiffer et al., 2002*), en tanto Hernández *et al., (2001)* señalan decremento del 3-4% de la producción. Lo que puede resultar cierto, es que la baja en la producción se deba más a la presencia del aborto que a la seropositividad (*Hobson et al., 2002*).

4.8 *Neospora caninum*: características antigénicas y comportamiento ante la respuesta defensiva del hospedero

Los parásitos *T. gondii* y *N. caninum*, poseen proteínas que muestran secuencias muy conservadas, localización muy similar y probablemente función similar. No obstante, existe diferencia antigénica evidente, por lo que se descarta reactividad cruzada entre epítopes (*Howe et al., 1998; Hemphill et al., 1999*).

Se conoce la existencia de alrededor de 20 antígenos inmunodominantes de *N. caninum* que tienen un peso promedio entre los 16 y 80 kilodaltons (kDa) (*Barta y Dubey, 1992*). Estos antígenos se localizan en el interior de los gránulos densos (GRA), asociados a la membrana de la vacuola parasitófaga (VP), como NcGRA7 (33kDa) y NcGRA6 (37kDa), cuya función es la de establecer la adecuada fusión de la VP a la célula hospedero (*Fuchs et al., 1998; Buxton et al., 2002*). En la parte posterior de los roptries de los taquizoitos (ROP), se localizó una sola proteína

de 17 kDa, inmunodominante e importante en la interacción con la célula hospedero (*Barta y Dubey, 1992*).

Independientemente de que el contenido de los micronemas se secreta por la zona apical a la superficie de la célula hospedadora, sus proteínas MIC, O y MAP de 38, 60 y 95 kDa respectivamente, intervienen como mediadores en el proceso de invasión por unión entre el parásito y la célula (*Keller et al., 2002; Keller et al., 2004*).

Además, se identificó una familia de al menos 8 antígenos denominados SAG, antígenos superficiales y SRS, secuencias relacionadas a SAG1, como el NcSAG1, proteína de 29/36 kDa que se localiza exclusivamente en la superficie de los taquizoitos y el NcSRS2 de 35/43 kDa, que se ubica en la superficie de bradizoitos y taquizoitos, ambos participan en la adherencia pre-invasión con función similar (*Hemphill y Gottsein, 1996; Howe et al., 1998; Hemphill et al., 1999*).

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales, Hemphill et al, (1999) identificaron los antígenos de 18, 30/32, 41 y 65 kDa; particularmente, los anticuerpos contra los antígenos 18 y 41 kDa se enlazan a la superficie del taquizoito, en tanto el antígeno de 65 kDa, que se identifica mediante un anticuerpo monoclonal (MAb) se une a un epítopo hidrocarbonado ausente en *T. gondii*. La especificidad de este MAb permitió desarrollar un ensayo inmunoenzimático (ELISA) competitivo eficiente para el diagnóstico. En cuanto al antígeno de 18 kDa mostró, por

Western-blot, estar compuesto parcialmente por residuos de carbohidratos, lo que coincide con otros trabajos en los que se evidencia la diferencia antigénica entre las proteínas de superficie encontradas en taquizoitos y bradizoitos de *N. caninum* y *T. gondii* (McAllister et al., 1996).

La información acerca de la respuesta a las infecciones por *N. caninum* en bovinos es escasa; sin embargo, se conoce que *N. caninum* estimula la producción de interleucina (IL12) seguida de interferon γ (INF γ) en infecciones naturales y experimentales (Andrianarivo et al., 2000; Almeria et al., 2003; Dion et al., 2011). El aumento en la producción de INF γ incrementa la apoptosis en células parasitadas, esta inducción y la inhibición asociada a la multiplicación probablemente colaboren en limitar la extensión de la infección en el hospedero (Nishikawa et al., 2001). Las IL 12 inducen la generación de INF γ y el desarrollo de células Th1, y activan vías que generan radicales libres y óxido nítrico (ON), los cuales son letales para dichos parásitos (Hunter y Reiner, 2000).

En infecciones naturales, el parásito puede persistir indefinidamente en el sistema nervioso central del huésped, mediante la formación de un quiste donde los bradizoitos se replican, así, el parásito y el huésped pueden vivir en simbiosis hasta que el animal se preña (Dubey et al., 1988^b; Quinn et al., 2002).

Existe una relación dinámica entre la respuesta inmune materna, el desarrollo de la respuesta inmune fetal y el parásito (Williams et al., 2000; Thellin y Heinen, 2003).

En la etapa gestacional, los mecanismos hormonales e inmunes maternos sumados al desarrollo del sistema inmune fetal actúan de tal manera que determinan si la infección desencadena la muerte del feto y el subsecuente aborto (*Entrican, 2002; Innes et al., 2002; Quinn et al., 2002*) o la transmisión vertical con nacimiento de un ternero clínicamente normal pero congénitamente infectado (*Dubey y Lindsay, 1996*), que en caso de ser hembra, transmitirá el parásito a su descendencia, con alto riesgo de abortar (*Macaldowie et al., 2004; Gibney et al., 2008*).

Durante el primer trimestre de la gestación bovina, la respuesta Th1 y la producción de INF γ , IL2, IL3, IL12 e IL18, promueven actividades citolíticas en macrófagos, células dendríticas y NK, activan la protombina lo que facilita la coagulación y la trombosis y, del mismo modo estimulan la producción de inmunoglobulinas que activan la cascada del complemento (*Hope et al., 2004; Olsen et al., 2005*). Roberts *et al.*, (2001) aseguran que la madre puede controlar la infección durante el primer trimestre debido a que tiene una respuesta Th1 bien establecida con bajos los niveles de progesterona y respuesta Th2. Lo que coincide con los trabajos realizados por Maley *et al.*, (2006) y Rosbottom *et al.*, (2008), quienes encontraron infiltrados inflamatorios consistentes básicamente en Th1 en carúnculas materno-placentarias, lo que apoya que la infección en etapas tempranas de la gestación activan una respuesta Th1 en la placenta.

Considerando que la mayoría de los abortos observados naturalmente ocurren entre el tercer y sexto mes de gestación, la fisiopatología del aborto por *N. caninum* se explicaría por la incapacidad de controlar la infección debido a una respuesta inmune tipo Th2 asociada a altos niveles de progesterona y estrógenos, a los cuales se les atribuye efecto inmunosupresor (*Innes et al., 2001; Quinn et al., 2002; Bartley et al., 2004*). La producción de IL4, IL5, IL9 e IL10; así como la reducción en la producción de moléculas pro-inflamatorias como IL12 parecen beneficiosas para la gestación, pues se reducen los efectos perjudiciales de la respuesta inmune materna tipo Th1 (INF γ y FNT) (*Entrican, 2002*); pero por otra parte se facilita la reactivación de bradizoitos, la parasitemia e inclusive la transmisión transplacentaria, las cuales son perjudiciales para la vida fetal, quizá por su limitada capacidad para resolver la infección (*Innes et al., 2002*).

Durante el tercer trimestre, se observa infección congénita aunque es menor la probabilidad de observar aborto debido a la maduración del sistema inmune fetal (*Williams et al., 2000; Williams et al., 2003; Macaldowie et al., 2004*), la cual comienza a desarrollarse a los 100 días de gestación, pero sólo posterior a los 150 días el feto es capaz de reconocer y responder al parásito, lo que sugiere que el feto puede sobrevivir a la infección si esta se da a finales de la gestación. Por otro lado, la transmisión vertical ocurre durante este trimestre cuando los altos niveles de progesterona asociada a la respuesta Th2 son incapaces de controlar el protozoo (*Anderson et al., 2000*).

Debido a las características de la placenta sindesmocorial de los bovinos, las inmunoglobulinas maternas no llegan al feto (Tizard, 2002), por lo que a partir del día 100 de gestación, éste responde por medio de las células del nódulo linfático induciendo blastogénesis. Andrianarivo *et al.*, (2001) demostró, en ganado sano inoculado con *N. caninum* entre los 159 y 169 días de gestación, respuesta celular proliferativa y producción de INF γ , en tanto fetos removidos entre los 219 y 231 días de gestación mostraron una fuerte respuesta humoral.

4.9 Diagnóstico de *Neospora caninum*

4.9.1 Exámenes generales macroscópicos

- 4.9.1.1 Examen clínico. El examen clínico de un animal infectado congénitamente de hasta 2 meses de edad, puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar, parálisis progresiva o falta de sensibilidad propioceptiva (sentido que informa la posición de los músculos), y eventualmente se pueden presentar anomalías congénitas como exoftalmia o asimetría ocular (Moore *et al.*, 2005).
- 4.9.1.2 Lesiones macroscópicas en placenta y fetos. Es un hallazgo frecuente, la inflamación considerable de los tejidos maternos (septos) con células necróticas (Macaldowie *et al.*, 2004).

Los fetos abortados usualmente se encuentran autolíticos sin lesiones macroscópicas aparentes. Sin embargo, se pueden observar grados variables de momificación alrededor del tercer mes de gestación, aunque no se considera patognomónico (*Campero et al., 2003*).

4.9.2 Métodos directos

- 4.9.2.1 Histopatología, mediante esta técnica se puede identificar al parásito así como lesiones microscópicas, principalmente cerebro, corazón e hígado mediante tinción con hematoxilina- eosina (HE) y con el cual se puede realizar un diagnóstico presuntivo de infección parasitaria (*Anderson et al., 2000; Oviedo et al., 2008; Lértora et al., 2010*).

El número de parásitos que se distinguen en los fetos abortados son escasos, sin embargo, su presencia sugiere la diseminación del parásito a través de la circulación fetal al corazón, cordón espinal y cerebro, así mismo se observa infiltración de células mononucleares, aumento de basofilia debido a la autólisis y aumento del espacio perivascular (*Anderson et al., 2000; Macaldowie et al., 2004*).

Las lesiones en el sistema nervioso central incluyen congestión de vasos meníngeos (cerebro) que va de leve a moderada; hacia la sustancia gris del cerebelo se encuentran focos de necrosis rodeados con frecuencia de

células inflamatorias mononucleares y gliosis focal (*Anderson et al., 2000; Jenkins et al. 2002; Collantes-Fernández y Ortega-Mora, 2003; Pereira-Bueno et al., 2003; Oviedo et al., 2008; Lértora et al., 2010*).

Los hallazgos en el tejido cardíaco se caracterizan por infiltrado inflamatorio celular mononuclear en el epicardio, miocardio, endocardio, con necrosis multifocal asociada con una leve mineralización y definida como una miocarditis no supurativa, epicarditis no supurativa y/o miositis focal no supurativa (*Anderson et al., 2000; Jenkins et al. 2002; Collantes-Fernández y Ortega-Mora, 2003; Pereira-Bueno et al., 2003; Oviedo et al., 2008; Lértora et al., 2010*).

En el hígado se presentan múltiples focos necróticos e inflamación no supurativa compuesto principalmente por linfocitos y células plasmáticas con distribución periportal denominada hepatitis necrótica y linfoplasmocitaria (*Anderson et al., 1994, Anderson et al., 2000*).

Tanto en el tejido muscular como en el hepático, se pueden llegar a identificar taquizoitos libres o en grupos, sin embargo con la tinción histológica de rutina (HE) es muy difícil identificarlos. Así mismo, el pulmón, los riñones, el bazo y la placenta pueden tener infiltración de células inflamatorias mononucleares y necrosis (*Thurmond et al., 1999; De Meerschman et al., 2002*).

- 4.9.2.2 Inmunohistoquímica, se considera una prueba altamente específica, aunque poco sensible (*Anderson et al., 2000; Campero et al., 2000*) en la que se utilizan antisueros policlonales de *Neospora* para identificar estructuras parasitarias principalmente en cerebro, pulmón, hígado y músculo esquelético del feto abortado, sin reacción cruzada con *T. gondii* (*Peters et al., 2001; Lértora et al., 2004; Dubey y Schares, 2006*).
- 4.9.2.3 Cultivo de taquizoitos, mediante esta técnica, se logra la proliferación de los parásitos en cultivos celulares con medio esencial mínimo (MEM) con el fin de identificarlos, aunque también, pueden representar una buena fuente de antígeno para el diagnóstico serológico (*Venturini et al., 1995*).
- 4.9.2.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta es útil para detectar el parásito en suero sanguíneo de bovinos, en muestras antemortem (*Schatzberg et al., 2003*) y tejidos de fetos de bovinos abortados (corazón, cerebro, músculos), aún autolíticos (*Suteu et al., 2010*) aunque en la experiencia de algunos autores la amplificación del ADN del parásito no se puede realizar bajo estas condiciones.

Se describen diferentes modificaciones, como los PCR anidadas, semianidadas o en tiempo real que intentan incrementar la sensibilidad y especificidad de la técnica (*Anderson et al., 2000; Pereira-Bueno et al., 2003; Schuster et al., 2011*) y que amplifican el fragmento ITS1 (*Collantes-Fernández y Ortega-*

Mora, 2003; Habibi, et al., 2005) o la secuencia del gen pNc5 de *Neospora* en 337 y 227 pares de bases (pb) (*Kaufmann et al., 1996; Collantes-Fernández y Ortega-Mora, 2003*).

Presentan ciertas desventajas como el alto costo, tiempo, equipo y experiencia para el desarrollo de la prueba, por lo que no se practica como diagnóstico de rutina (*Anderson et al., 2000*).

- 4.9.2.5 Microscopía electrónica, se utiliza para identificar estructuralmente al parásito en el sistema nervioso central de fetos bovinos, pero, sin embargo, su gran desventaja radica en que el material y equipo necesario es altamente sofisticado y costoso (*Speer et al., 1999; Dubey et al., 2002*).

4.9.3 *Métodos indirectos*

- 4.9.3.1 Inmunofluorescencia indirecta, se emplean portaobjetos fijados con células “Vero” infectadas con *Neospora sp.* y suero anti-IgG1-IgG2 bovino marcado con fluoresceína, para observarse en microscopio de luz U.V a 40X. Se considera resultado positivo cuando se observa brillo en el contorno del taquizoítio, y negativo, en caso de que la fluorescencia sea incompleta o sólo en la zona apical (*Barr et al., 1995; Björkman y Uggla, 1999*).

- 4.9.3.2 Ensayo Inmunoenzimático (ELISA), mediante esta técnica se detectan en suero sanguíneo o leche anticuerpos anti-*Neospora caninum* con alta concordancia (Ortega et al., 2007). Se recomienda cuando el objetivo es realizar estudios seroepidemiológicos en un gran número de muestras, ya que requiere de menos tiempo para su ejecución y es de menor costo (Lasri et al., 2004; Chen et al., 2011). No obstante que hay fluctuaciones en los títulos de anticuerpos éstas no son indicativas de que vacas positivas puedan seroconvertir (Anderson et al., 2000; Son et al., 2011). Además, se reporta una buena correlación entre las lesiones presentes en los fetos y el resultado serológico de sus madres (Son et al., 2011).

Es importante mencionar que el resultado positivo, en cualquiera de las técnicas mencionadas y aún en vacas que abortaron, solo es un buen indicador de la exposición natural al parásito, pero no confirma la causa de aborto (Thurmond et al., 1999).

4.10 Diagnóstico diferencial de *Neospora caninum*

Neospora caninum no produce signos previos al aborto bovino que permitan diferenciarla clínicamente de otras infecciones, por ello se debe diferenciar de *Toxoplasma gondii* por su similitud taxonómica y morfológica, y por sus efectos en la producción y reproducción bovina, de brucelosis, DVB e IBR (Björkman et al., 2000).

4.10.1 *Toxoplasma gondii*

La Toxoplasmosis es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo, resultante de la infección por *T. gondii*, es un protozoo parásito intracelular que se relaciona filogenéticamente con *N. caninum*, no obstante exhiben importantes diferencias, pues es responsable de pérdidas reproductivas en humanos, ovejas, cabras principalmente (Klevar, 2007; OIE, 2008), donde participan los felinos como hospederos definitivos. La infección de manera natural por *T. gondii* en bovinos no se detecta por técnicas de PCR o ELISA (Klevar, 2007; Moore et al., 2008; OIE, 2008); sin embargo, la inoculación experimental de cepas virulentas a hembras gestantes resulta en la expulsión del producto, pero no se observan taquizoitos del parásito en el feto (Wiengcharoen et al., 2011).

Se considera que los taquizoitos de *N. caninum* y *T. gondii* son estructuralmente similares; debido a que estudios de la ultraestructura parasitaria mediante microscopia electrónica permitieron distinguir diferencias entre ambos parásitos con respecto al número, apariencia y localización de roptrias, micronemas, microporos y gránulos densos (Speer et al., 1999; Dubey et al., 2002).

Los quistes de ambos parásitos están rodeados de una pared no compartimentada por tabiques, sin embargo, la pared del quiste de *T. gondii* tiene apariencia lisa y de 0.5 μm de espesor, en tanto que en *N. caninum* es irregular y sustancialmente gruesa de 0.5 a 4 μm (Fig. 12) (Speer et al., 1999).

Los ooquistes en *T. gondii* y *N. caninum*, son esencialmente semejantes en estructura y tamaño, por lo tanto son morfológicamente indistinguibles, ambos son esféricos, con una pared delgada y con diámetros semejantes, por lo que su hallazgo no es un método de elección para el diagnóstico (McAllister et al., 1998; Dubey et al., 2002).

4.10.2 *Brucelosis*

La brucelosis se reporta en casi todos los estados de la República Mexicana, lo que indica que puede presentarse en todos los climas aunque es más prevalente en ganado lechero en sistemas de manejo intensivos (Moreno, 2002). Por su importancia en salud pública, en 1971 se creó la aún vigente “Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales” que se reactivó en 1993, sus estrategias se dirigen a ingresar en las categorías de erradicación, libres o de control, según la zona (SAGARPA, 1997). Actualmente se reconoce a la región norte de Sonora libre de brucelosis, en tanto el sur de Sonora, Yucatán, Baja California Sur, Región “Costas” de Guerrero, Región “A” de Campeche y Quintana Roo están en fase de erradicación y el resto del país en control (www.senasica.gob.mx 14 de marzo del 2012).

Es una enfermedad infectocontagiosa de curso crónico producida por un cocobacilo aeróbico Gram negativo, comprende varias especies como: *B.*

abortus, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis* que afectan al ganado bovino, caprino, porcino, caninos y ovinos respectivamente (Beers et al., 2006).

Uno de los sitios de replicación predilectos de la bacteria, es el endometrio grávido y la placenta, especialmente los trofoblastos, (Meador y Deyor, 1989) los cuales una vez infectados, producen cortisol (hormona esteroideal), por otro lado, se elevan los niveles de prostaglandinas $F2\alpha$ y disminuyen los de progesterona, sustancias producidas en el proceso normal de parto. Estos cambios hormonales, junto con las lesiones producidas por la invasión bacteriana como endometritis ulcerativa en los espacios intercotiledonarios, hemorragias, necrosis y principalmente la inflamación (Sangari, 2000), interfieren con la circulación de oxígeno y nutrientes fetales que causan la muerte y a las 24 o 72 horas expulsión fetal generalmente en el último trimestre de gestación, posterior a un período de incubación menor a 60 días, sin dolores ni cólicos por parte de la madre (D' Pool et al., 2005). Las secuelas que se identifican son retenciones placentarias, metritis, infertilidad y baja en la producción de leche hasta en un 30% (Herrera et al., 2004; Rodríguez y Ramírez, 2005).

Las lesiones macroscópicas en la placenta incluyen inflamación y focos necróticos en cotiledones; en fetos, líquido serohemorrágico en cavidades y subepidermis, así como bronconeumonía acompañada de congestión, exudado fibrinoso e infiltración celular (Beers et al., 2006).

4.10.3 *Diarrea Viral Bovina (DVB)*

Uno de los patógenos ampliamente difundidos en la población bovina del mundo con tendencia a ser endémica es el virus de la Diarrea Viral Bovina. Es un virus envuelto compuesto de una cadena simple de ARN que pertenece al género *Pestivirus* familia *Flaviviridae*, y cuyo biotipo predominante en la naturaleza es no citopático (NCP) (Ronchi et al., 2001; Morales y Slever, 2002; Aly et al., 2003; Lértora, 2003; Lindberg et al., 2004).

El efecto del virus sobre el producto de la concepción, durante la preñez, depende del biotipo, dosis y del período de la gestación de la vaca. El virus, específicamente el biotipo NCP, es capaz de cruzar la placenta, de manera que el embrión se puede reabsorber si la infección ocurre desde la concepción hasta los 42 días, o muerte y aborto con momificación entre los 50 a 100 días de gestación (Viet et al., 2004).

Su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica puede ocasionar teratogénesis y lesiones como microcefalia, hidrocefalia e hipoplasia cerebelosa en fetos entre los 100 y 150 días debido a que en esta etapa finaliza la organogénesis del sistema nervioso (Lértora, 2003; Muñoz- Zanzil et al., 2003; Niskanen y Lindberg, 2003; Tolga et al., 2006).

4.10.4 *Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (RIB)*

La Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, causada por el Virus Herpes Bovino - 1 (VHB-1), pertenece al género *Varicellovirus* familia *Herpesviridae*, su material genético está conformado por una doble cadena lineal de ADN dentro de una nucleocápside icosaédrica compleja (OIE, 2010).

En vacas gestantes, el virus se aloja en las carúnculas placentarias aproximadamente entre el 5º y 8º mes de gestación, para después invadir al feto, y dañar el hígado, bazo, riñón, timo y linfonódulos, lo que provoca finalmente aborto entre la 3^{ra}. y 6^{ta}. semana posterior a la infección que se asocia generalmente a la presencia de fiebre (Richey, 1994; Chase et al., 1995). El tiempo entre la muerte del feto y su expulsión oscila entre los 8 y 45 días, por lo que macroscópicamente se puede encontrar diferentes grados de autólisis, edemas y tejidos friables, las lesiones microscópicas características fetales son necrosis en hígado, riñón y cuajo (Beers et al., 2006).

4.11 Control de *Neospora caninum*

No hay programas específicos de control y tratamiento para la neosporosis, pues se observa que la eliminación del parásito en el bovino infectado a través de la quimioterapia o de la propia respuesta inmune post-infección se dificulta por la habilidad que tiene *N. caninum* para formar quistes en el tejido nervioso,

lo que le brinda protección y le permite persistir por tiempo indefinido (Dubey, 2003).

Algunas drogas que demuestran ser efectivas *in vitro* contra el agente son el diclazuril, robenidina, pirimetamina, la espiamicina, aunque no se recomiendan en el primer trimestre de la gestación. La clindamicina, parece evitar el paso de los taquizoitos al feto a través de la placenta (Lindsay *et al.*, 1994; Lindsay *et al.*, 1996). La tiazolidina nitazoxanida y algunos derivados demuestran actividad *in vitro* contra los taquizoitos del parásito, pues bloquean varias enzimas de la cadena respiratoria lo que afecta la producción de energía celular (Müller y Hemphill, 2011). La artemisona, artemisina sintética, demuestra su eficiencia *in vitro* e *in vivo* al desafío, sin causar efectos neurotóxicos (Mazus *et al.*, 2011 *In press*). Lo que no se debe perder de vista es que los productos químicos, que son efectivos *in vitro* o parcialmente efectivos para el tratamiento en la especie canina no necesariamente son útiles para bovinos con quistes y añadirían el riesgo de contaminar la leche con residuos químicos (Barr *et al.*, 1997).

Para el desarrollo de estrategias de control, sería necesario entender más acerca de la etiopatogenia de la enfermedad y fundamentalmente de cómo el sistema inmune del hospedador responde frente a este. No obstante, es recomendable realizar estudios serológicos periódicos en el hato para conocer el nivel de infección, así como en animales de nuevo ingreso y en aquellas

vacas que hayan abortado, con el fin de identificar y eliminar toda vaca seropositiva (*Dubey et al., 2007*).

Previo al primer servicio, se sugiere realizar al menos 2 pruebas serológicas y, en caso de inseminación artificial, asegurarse de no utilizar seroreactoras, en caso contrario, se recomienda realizarla con semen de ganado de carne (*López-Gatius et al., 2005; Andrighetto y Nardelli, 2006; Oliveira et al., 2010*). Los productos del aborto, como los fetos y la placenta deben recuperarse de modo que se evite la ingestión por carnívoros, además, los materiales contaminados deben desinfectarse. Es necesario, identificar y eliminar caninos portadores, y de ser posible, evitar el acceso de caninos al depósito de alimentos y agua (*Ghalmi et al., 2012; Meerburg et al., 2012*).

4.12 Vacunas contra *Neospora caninum*

A la fecha, existe una vacuna de alta eficacia a base de taquizoítos inactivados con SPUR® al 10% como adyuvante, pues al parecer, contribuye a su alta inmunogenicidad y estabilidad. Ese producto se aplica subcutáneamente aún en animales de 45- 75 días de gestación, estimula una respuesta de anticuerpos específicos y la producción de INFγ. La vacuna elaborada con el objetivo de reducir la incidencia de abortos no protege contra la transmisión vertical del parásito o de otros animales expuestos y susceptibles a infección (*Innes et al., 2002; Estill, 2004*); no obstante, estudios experimentales en ratones indican la

posibilidad de utilizar antígenos ciclofilina de *Neospora* (NcCyp) para contrarrestar esta limitante, pues estos estimulan una reacción inmunitaria capaces de limitar la sobrevivencia del parásito en el hospedero (*Wen et al., 2011*), pero aún presenta baja eficiencia, al mantener la tasa de abortos sin cambios y representar un elevado riesgo de muerte temprana del embrión (*Weston et al., 2012*).

5. PARTE EXPERIMENTAL

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Experimento I. Identificación de *Neospora caninum* en tejido cerebral de fetos bovinos mediante histopatología y la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (PCRtr).

Introducción

Neospora caninum es un protozoario intracelular (Hemphill et al., 1999; Moore et al., 2005) que se detecta en la mayoría de las especies domésticas, entre ellos el bovino (Dubey, 2003; Dubey et al., 2006), quién participa como hospedero intermediario (Campero et al., 2003; Alaedine et al., 2005), y en cuyo organismo se desarrollan dos estadios: los taquizoitos y los bradizoitos. Los taquizoitos infectan y se multiplican rápidamente en una amplia variedad de células incluyendo neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, hepatocitos y células renales (Dion et al., 2011).

Debido a la respuesta inmune del hospedero los taquizoitos se transforman en bradizoitos, que se dividen lentamente hasta formar quistes tisulares en el sistema nervioso central. En estados de inmunodepresión, como en el período de la gestación, los quistes se rompen y la infección se reagudiza (*Lértora et al., 2004*) como consecuencia del efecto inhibitorio de la progesterona sobre la producción de óxido nítrico y del FNT α , así como sobre la actividad de las células asesinas naturales (*Collantes-Fernández y Ortega – Mora, 2003*).

Los bradizoitos liberados invaden al feto vía transplacentaria, con la consecuente destrucción de las células septales y degeneración aguda de las vellosidades placentales fetales, asociadas a un daño vascular con la posible falta de oxígeno-nutrición, lo que desencadena el aborto (*Maley et al., 2003; Gondim et al., 2004; Dubey et al., 2006*).

El valor sobre la presencia de abortos bovinos del 11.4% en la zona lechera de Hidalgo, México, con tendencia a aumentar por falta de financiamiento para su control (*Xolalpa et al., 2003; Escamilla et al., 2007; Romero et al., 2009*), y las elevadas seroprevalencias a *N. caninum* en los hatos en las principales cuencas lecheras del país (*Morales et al., 2001^a, 2001^b; García-Vázquez et al., 2002, 2005*), permiten sospechar la presencia del parásito, sin embargo, la información con respecto al hallazgo del mismo en fetos bovinos no existe por lo que, en los casos de aborto, es indudablemente necesaria, principalmente por el elevado porcentaje

de abortos que puede causar, las pérdidas en producción y reproducción (Hernández et al., 2001; Medina, 2008; Romero-Salas et al., 2010).

La demostración del parásito en fetos abortados se realiza por métodos rutinarios que incluyen el examen histopatológico, en donde se evidencian lesiones microscópicas predominantemente en sistema nervioso central (Jenkins et al., 2002; Collantes-Fernández y Ortega-Mora 2003; Dubey 2003; Lértora 2004). Técnicas como el PCR proporcionan gran sensibilidad y especificidad en sus diversas variantes, como los PCR anidadas, semianidadas o en tiempo real (Anderson et al., 2000; Pereira-Bueno et al., 2003; Schuster et al., 2011), no obstante, la PCRtr permite monitorizar en cada ciclo la aparición del ADN producto de la reacción, mediante el uso de fluoróforos. Además, tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización, por lo que es más económica que aquella que usa sondas específicas (VanGuilder et al, 2008).

Por lo anterior, el objetivo del presente experimento fue identificar lesiones histológicas coincidentes con *N. caninum* y presencia de ADN en tejido cerebral de fetos bovinos abortados.

Material y métodos

Se realizó muestreo probabilístico por conveniencia mediante notificación de los encargados de establos pertenecientes al estado de Hidalgo, México, así, se logró la recuperación 35 fetos abortados. Los cerebros de cada uno de los fetos, se removieron asépticamente por trepanación del cráneo (Anexo 1) y se tomaron dos porciones de aproximadamente 1cm de espesor de cada uno de los cerebros; las porciones del cerebro se colocaron en frascos estériles de boca ancha y tapón de rosca, uno de los cuales contenían 20ml de solución fijadora de formol al 10% por gramo de tejido, para la posterior detección del parásito *N. caninum* por histopatología (Anexo 2), el segundo frasco, se congeló a -20°C, para la identificación de ADN de *N. caninum* por la técnica PCRtr (Anexo 3) en 10 de las muestras que presentaron lesiones sugestivas a *N. caninum* por métodos histopatológicos. Los frascos, fueron cuidadosamente transportados al laboratorio cuidando la cadena fría.

La presencia de ADN se demostró a través de electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. El grado de pureza del ADN que se extrajo se analizó con un biofotómetro cuya absorbancia de lectura es el cociente entre 260 nm correspondiente a una solución de ADN doble hebra de 50 µg por ml en una cubeta de 1cm³ de camino óptico y aquella obtenida a 280 nm, rango que indica contaminaciones con proteínas. El rango del cociente, indica el alto grado de pureza entre 1.8 y 2 µg/ml; mientras que cocientes inferiores reflejan contaminación con proteínas.

La amplificación de ADN, de cada una de las muestras se realizó mediante el uso del termociclador ABI PRISM 7000 que incluye en su software un sistema automático de cálculo del valor umbral. El resultado del análisis de las muestras por PCRtr con el sistema de detección con dos fluoróforos, se representó mediante un gráfico de amplificación en el que se observan dos tipos de curvas: unas para el FAM (detector del patógeno) y otras para VIC (detector del IAC). La interpretación de los resultados del PCRtr se realizó según se refleja en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Interpretación de los resultados para los sistemas de detección de patógenos con 2 fluoróforos

Detector del Patógeno (FAM)	Detector de IAC (VIC)	Interpretación
Supera umbral	Irrelevante	Muestra positiva
No supera umbral	Supera umbral, sin retraso respecto al control negativo	Muestra negativa
No supera umbral	No supera umbral/ retraso respecto al control negativo	Muestra inhibida

Tabla 2. Interpretación de resultados a PCRtr

Interpretación	<<Detector>>Neospora	<<Detector>> IPC
Neospora Positivo	Ct < 45	Ct < 45 o Ct > 45
Neospora Negativo	Ct > 45	Ct < 45
Muestras no validadas	Ct > 45	Ct > 45

Resultados y discusión

Los resultados de las pruebas histopatológicas muestran en un 40% de las 35 muestras, lesiones coincidentes con las descritas en la literatura (*Anderson et al., 2000; Jenkins et al. 2002; Collantes-Fernandez y Ortega-Mora 2003; Lértora et al., 2004*), así mismo, en 10 de ellas, coexisten dos o tres de las lesiones (Tabla 1). El porcentaje obtenido se corresponde con los reportados en España (*Pereira-Bueno et al., 2003*) Colombia (*Oviedo et al 2008*), Brasil (*Cabral, et al., 2009*), Holanda (*Muskens et al., 2010*), e Irán (*Razmi et al., 2007*) quienes reportan compatibilidades del 57%, 71.4%, 35%, 27.8%, 11.8% y 22% respectivamente, por el método histopatológico.

La demostrada alta sensibilidad de este método permite evidenciar lesiones en ganado bovino lechero (*Anderson et al., 2000; Campero et al., 2000*), principalmente en muestras encefálicas. Trabajos previos determinan que la mayor carga parasitaria y, por tanto, la identificación de *N. caninum* es más exitosa en este órgano, pues se observa encefaliomelitis multifocal con características que incluyen focos de necrosis rodeados con frecuencia de células inflamatorias mononucleares, gliosis focal y quistes tisulares en animales infectados natural y artificialmente (*Jenkins et al. 2002; Collantes-Fernández y Ortega-Mora, 2003; Pereira-Bueno et al., 2003; Lértora et al., 2004; Lértora et al., 2010*).

Tabla 3. Lesiones identificadas en cerebros de fetos bovinos coincidentes con *Neospora caninum* por métodos histopatológicos.

Muestra	Necrosis	Gliosis	Células mononucleares	Vasos sanguíneos congestionados	Quistes
1	Focal		X	X	
2			X		
3	Multifocal		X	X	
4	Focal	Difusa			
5	Focal		X		X
6			X	X	
7	Focal	Difusa			
8	Multifocal	Difusa			
9			X		X
10	Multifocal		X		X
11	Focal	Difusa			
12		Difusa			
13			X		
14	Multifocal		X	X	
Total	25.71%	14.28%	22.85%	11.42%	8.57%

La demostrada alta sensibilidad de este método permite evidenciar lesiones en ganado bovino lechero (*Anderson et al., 2000; Campero et al., 2000*), principalmente en muestras encefálicas. Trabajos previos determinan que la mayor carga parasitaria y, por tanto, la identificación de *N. caninum* es más exitosa en este órgano, pues se observa encefaliomelitis multifocal con características que incluyen focos de necrosis rodeados con frecuencia de células inflamatorias mononucleares, gliosis focal y quistes tisulares en animales infectados natural y

artificialmente (Jenkins et al. 2002; Collantes-Fernández y Ortega-Mora, 2003; Pereira-Bueno et al., 2003; Lértora et al., 2004; Lértora et al., 2010).

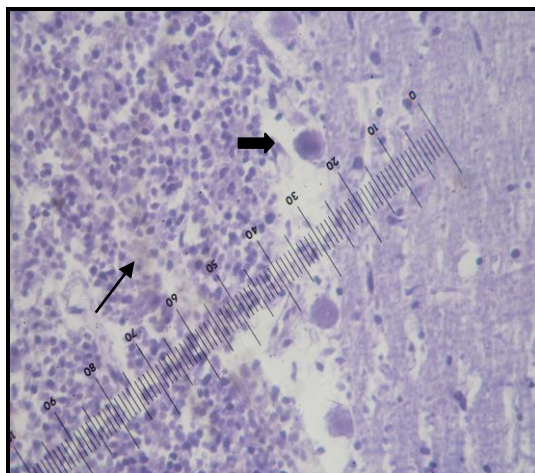


Fig. 1. Focos de necrosis y gliosis (40X)

La evaluación en detalle reveló lesiones indicativas de que ooquistes esporulados o bradizoitos liberados en el epitelio intestinal pueden alcanzar la vía sanguínea materna (Dubey et al., 1988^{a b}), extenderse a las vellosidades placentarias y al feto (Williams et al., 2000), lo que genera focos de necrosis identificados en 25.71% de las muestras (Fig. 1), estos se producen probablemente por la multiplicación intracelular del parásito (Dubey et al., 2006) y la incapacidad de la célula hospedero a restaurar sus funciones lo que conduce a su destrucción con la consecuente reacción local de tipo inflamatorio (Fig. 2) (Nishikawa et al., 2001).

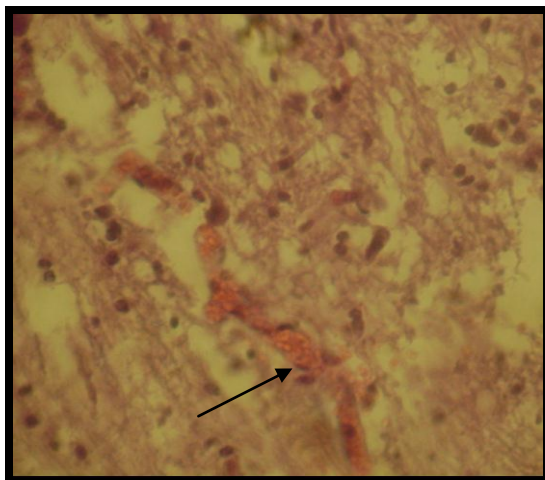


Fig. 2. Corte histopatológico de cerebro de feto bovino que presenta vasos sanguíneos congestionados (40X)

Se evidenció gliosis en un 14.28% (Fig. 1), estas células no solo forma una barrera hematoencefálica como medio de protección y reparación de las lesiones que produce el parásito en el sistema nervioso, sino que son parte activa de los procesos locales de defensa de manera directa, al secretar y ser blanco de diferentes citocinas y quimocinas que participan en la respuesta inflamatoria del sistema nervioso (González y Toro, 2007), lo que da por resultado, el aumento de la permeabilidad y migración de leucocitos mononucleares observados en el 22.85% de las muestras sometidas a estudio (Fig. 3).

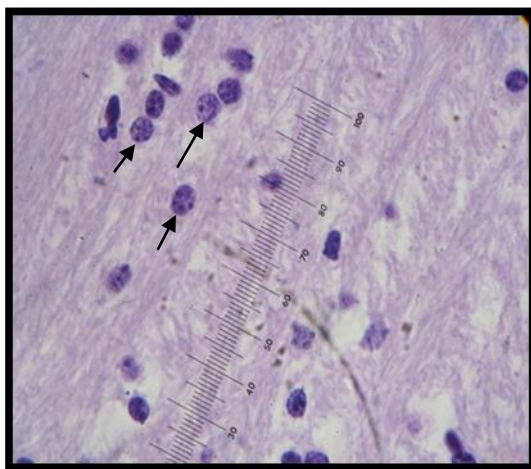


Fig. 3. Presencia de células mononucleares en tejido cerebral de fetos bovinos (100X)

Estos acontecimientos, provocan que los parásitos se dividan lentamente y formen quistes identificados en tres muestras (8.57%) de los 35 tejidos cerebrales de fetos bovinos evaluados (Fig.4) y que resultan compatibles con la morfología descrita por otros investigadores (*Razmi et al., 2007; Zhang 2007*). Otros autores no logran la identificación de lesiones o quistes en cerebro por histopatología, debido principalmente a la autólisis o a alteraciones postmortem (*Paredes y Moroni 2005; Suteu et al., 2010*), no obstante, técnicas como PCR ofrecen la ventaja de detectar al parásito aún bajo estas condiciones, sumado a su elevada confiabilidad, sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, rapidez y simplicidad (*Suteu et al., 2010*).

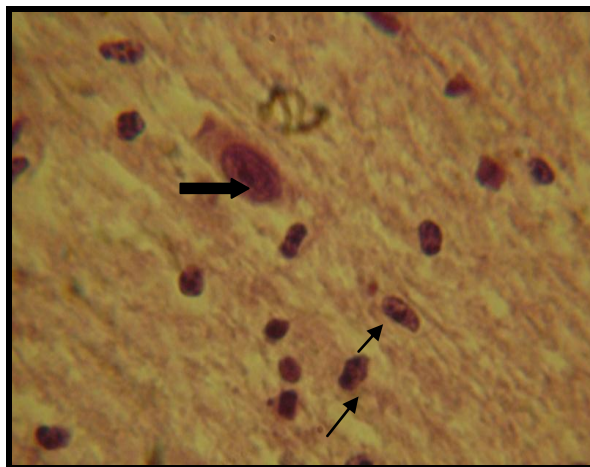
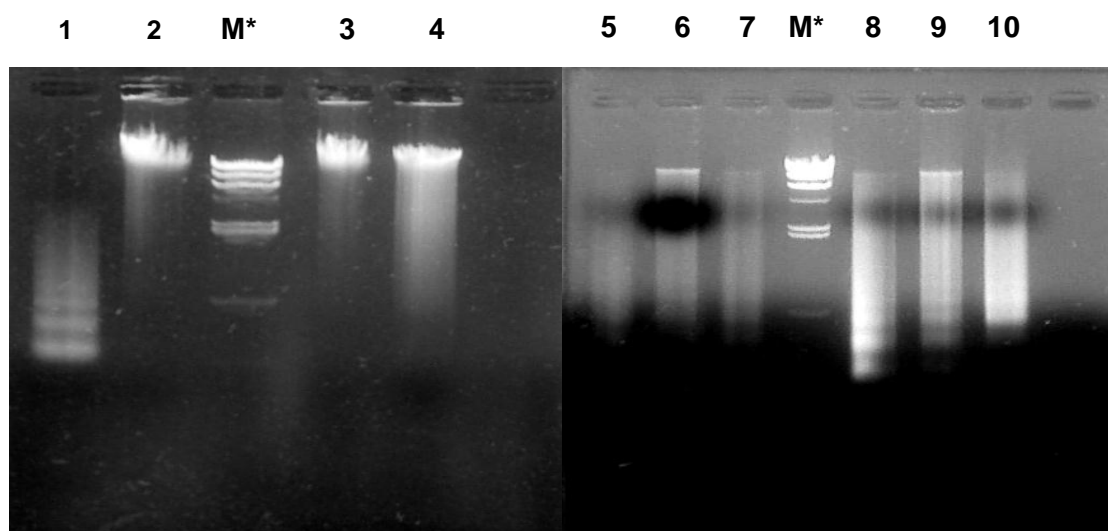


Fig. 4. Presencia de células mononucleares y quiste de *Neospora caninum* en fetos bovinos (100X)

En el presente estudio, 5 de las 10 muestras (50%) de cerebro fetal bovino que presentaron lesiones sugestivas a *N. caninum* fueron también positivas a la prueba de la PCRtr. En sólo una de las muestras positivas por el método de PCRtr se identificó una estructura coincidente con un quiste (muestra 9), y en las muestras 2, 3, 4, 6 y 9 se observó infiltrado mononuclear, que se produce como medio de defensa contra el parásito.

Otros trabajos refieren positivities de 30 a 75% por la prueba de la PCR en sus diferentes variantes (Paula, 2004; Okeoma et al., 2005; Suteu et al., 2010) con elevada relación entre los cambios histopatológicos en los tejidos fetales abortados y los resultados por la PCR (Hughes, 2006), pues al ofrecer distintas características diagnósticas, se disminuye el margen de error si se utilizan conjuntamente (VanGuilder et al, 2008; Cabral et al., 2009).

La determinación de ADN por electroforesis de las muestras sometidas a estudio mostró mayor integridad en las muestras 6 y 9 (Fig. 5). Las muestras 2, 3, 4, 6 y 9 (Tabla 4), cuyos cocientes resultaron en el rango de 1.8 y 2 µg/ml se seleccionaron como analitos para llevar a cabo la amplificación y determinación de *N. caninum*.



M* marcador

Fig. 5 Presencia de ADN en muestras de cerebro de fetos bovinos abortados gel de agarosa al 1%

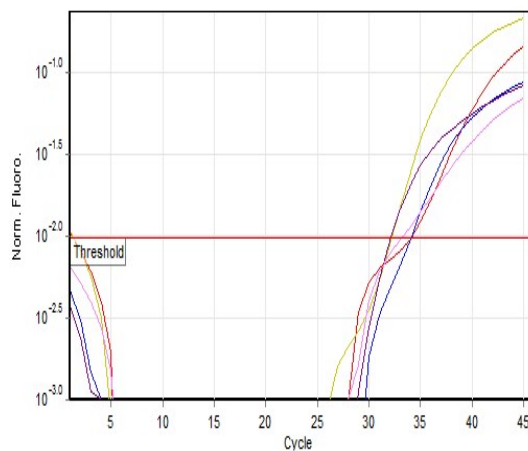
La secuencia diana del gen p-Nc5 que se utilizó para determinar la presencia de *N. caninum*, y cuyos cebadores constan de un primer inicial (5'-CTGGAGGCACGCTGAACAC-3') y un primer inverso (5'-ACAATGCTTCGCAAGAGGAA-3'), es una secuencia repetitiva muy conservada que no se encuentra en otros parásitos relacionados filogenéticamente, lo que permite la diferenciación inter e

intra especies y la determinación específica de *N. caninum* en órganos de fetos bovinos abortados, principalmente en cerebros (Okeoma et al., 2005; Hughes, 2006).

Tabla 4. Resultados de lecturas espectrofotométricas y determinación del grado de pureza

Número de muestra	Concentración de ADN (µg/mL)	Cociente de pureza 260 nm/ 280 nm
1	0.3 µg/mL	1.14
2	0.8 µg/mL	1.80
3	1.4 µg/mL	1.80
4	1.2 µg/mL	1.85
5	0.3 µg/mL	1.25
6	0.9 µg/mL	1.85
7	0.2 µg/mL	1.25
8	0.9 µg/mL	1.58
9	0.6 µg/mL	1.80
10	0.6 µg/mL	1.29

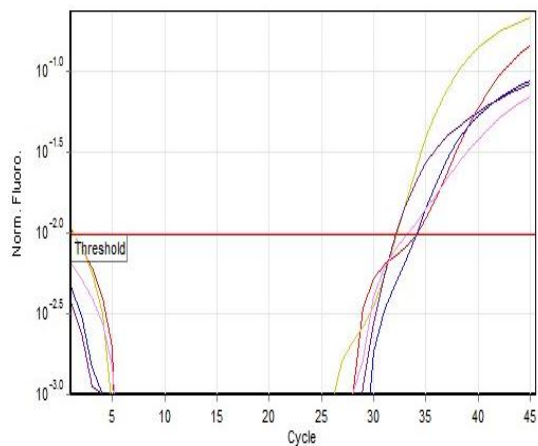
La amplificación de ADN, reveló incremento de la fluorescencia en las muestras 2, 3, 4, 6 y 9 con valores de Ct (Ciclo umbral) de 16.29 a 34.82 (Fig. 6 y Fig. 8), por tanto se consideran muestras positivas a *N. caninum* ya que superan el valor de umbral con el fluoróforo FAM, independientemente del comportamiento de la curva VIC que presentaron (Fig. 7 y Fig. 9).



Reacciones	Color	Tipo de Muestras	Ct*
1	■	Control Positivo EPC	34.7
2	■	Control Positivo EPC	33.12
3	■	Muestra cerebro 2	34.82
4	■	Muestra cerebro 3	33,20
5	■	Control Negativo	NEG
6	■	Control Negativo	NEG

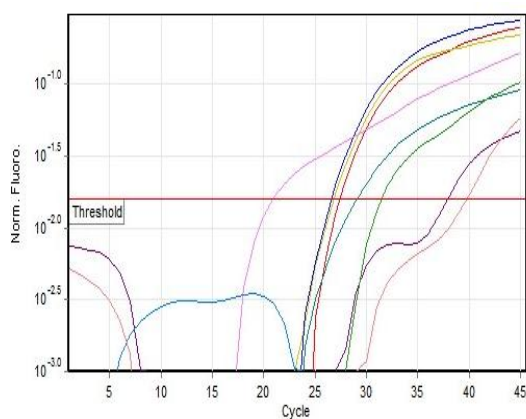
*Ct Ciclo umbral

Fig 6. Resultados obtenidos en las muestras 2 y 3 de cerebro fetal bovino mediante el fluoróforo FAM



Reacciones	Color	Tipo de Muestras	Ct
1	■	Control Positivo EPC	31.85
2	■	Control Positivo EPC	30.76
3	■	Muestra cerebro 2	34.01
4	■	Muestra cerebro 3	32.57
5	■	Control Negativo	NEG
6	■	Control Negativo	NEG

Fig 7. Resultados obtenidos en las muestras 2 y 3 de cerebro fetal bovino mediante el fluoróforo VIC









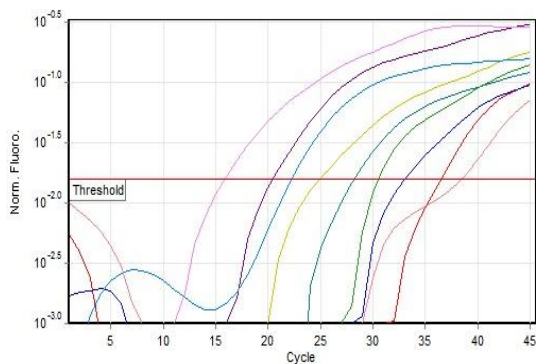
Reacciones	Color	Name	Ct
1		Control Positivo EPC	37.18
2		Control Positivo EPC	25.13
4		Muestra cerebro 4	21.03
5		Muestra cerebro 6	16.29
6		Muestra cerebro 9	23.05
7		Control negativo	NEG
8		Control negativo	NEG

Fig 8. Resultados obtenidos en las muestras 4, 5 y 6 de cerebro fetal bovino mediante el fluoróforo FAM









Reacciones	Color	Name	Ct
1		Control Positivo EPC	37.03
2		Control Positivo EPC	25.22
4		Muestra cerebro 4	21.12
5		Muestra cerebro 6	16.04
6		Muestra cerebro 9	23.45
7		Control negativo	NEG
8		Control negativo	NEG

Fig 9. Resultados obtenidos en las muestras 4, 5 y 6 de cerebro fetal bovino mediante el fluoróforo VIC

Los resultados que se obtuvieron por histopatología y por la PCRtr infieren la presencia de formas infectantes de *N. caninum* en los cerebros de fetos bovinos abortados de los establos de Hidalgo, México.

A pesar de que el diagnóstico presuntivo de infección por *N. caninum* puede basarse ineludiblemente en las lesiones histológicas en SNC mencionadas; a la hora de valorar el papel del parásito en el proceso abortivo, se debe ser cauteloso, aún cuando se encuentre el agente infeccioso en el feto, pues su presencia no supone una asociación causal, más aún cuando hay indicios de otras enfermedades abortivas. Técnicas como la PCRtr, que ofrecen alta sensibilidad y especificidad, resultan ser una herramienta útil para estudios epidemiológicos que contribuyen por tanto al control de la enfermedad.

Un recurso útil en establos con problemas abortivos es la adopción inicial de métodos indirectos disponibles actualmente, como el inmunoenzimático (ELISA), el cual resulta de gran ayuda cuando se analizan los resultados serológicos de un gran número de animales y se comparan con los obtenidos para otras enfermedades.

5.2 Experimento 2 Asociación serológica de *Neospora caninum* con *Brucella abortus* y los virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina y diarrea viral bovina en casos de aborto bovino lechero de Hidalgo, México.

Introducción

El parásito *N. caninum* es un protozoario identificado en los últimos años como uno de los agentes que afecta principalmente al ganado lechero con alto impacto económico en la producción y reproducción, básicamente, por la pérdida del producto de la concepción (Rivera *et al.*, 2004; Dubey y Schares, 2011).

Pese a la existencia de informes en el mundo referentes a la serología del agente en relación al aborto (Häsig y Gottstein 2002; Mineo *et al.*, 2006; Dubey y Schares, 2011); en México se reportan separadamente seroprevalencias que llegan al 75% y a cerca del 100% de los hatos en las principales cuencas lecheras del país (Morales *et al.*, 2001^a, 2001^b; García-Vázquez *et al.*, 2002, 2005) y valores por aborto de 11.4%, con tendencia a aumentar por falta de financiamiento para su control en la zona lechera de Hidalgo, México (Xolalpa *et al.*, 2003; Escamilla *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2009).

Por lo anterior, se hace necesario realizar estudios serológicos de agentes etiológicos relacionados con el aborto, no solo sobre aquellos que afectan la salud pública, como es el caso de la brucelosis bovina, cuya Campaña Nacional se centra básicamente en el estudio serológico periódico, identificación y

eliminación de reactores, implementación de cuarentenas y vacunación masiva (SAGARPA, 1997) sino sobre otros agentes como el parásito *N. caninum* y los virus de la diarrea viral bovina (DVB) y rinotraqueitis infecciosa bovina (RIB), pues conllevan a la merma en la producción, reproducción bovina, abortos y por consiguiente la afectación económica de las unidades de producción (Muskens et al., 2010), a la vez que se dificulta la toma de decisiones para la prevención y el control de enfermedades, más aún cuando diferentes agentes pueden coexistir en el mismo organismo.

En los resultados anteriormente expuestos, se evidenció la presencia del protozooario, por ello, en este experimento se tuvo como propósito, identificar la presencia serológica simultánea del parásito *N. caninum* con *B. abortus* y los virus de la diarrea viral bovina y rinotraqueitis infecciosa bovino en vinculación con el aborto en la población bovina de Hidalgo, México.

Materiales y métodos

Se seleccionaron aleatoriamente 10 establos lecheros localizados en el estado de Hidalgo, México, dentro de uno de los complejos agropecuarios más grande del país. De cada uno de ellos, se eligieron al azar 50 vacas lecheras de la raza Holstein- Freisan en producción, con una edad promedio entre 3 y 7 años, servidas mediante inseminación artificial y vacunadas contra brucelosis (cepa 19-vacuna viva) y el complejo viral (RIB inactivado, DVB inactivado, parainfluenza 3 (PI3) modificado y virus sincitial bovino (VSB) modificado), a las cuales, 10 meses

postvacunación se les realizó punción de la vena caudal utilizando agujas calibre 23 y tubos vacutainer de 7ml tapón rojo al vacío, para la obtención de la sangre. Las muestras obtenidas se identificaron y transportaron cuidando la cadena fría, hacia el Laboratorio de Inmunología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, donde se centrifugaron (centrífuga clínica Solbat) a 3000 rpm durante 5 min para obtener el suero, que se colocó en crioviales de 2ml para su conservación a -20°C hasta el análisis serológico.

La detección de la presencia de anticuerpos circulantes contra *N. caninum* y los virus de la DVB (Anexo 4) y RIB (Anexo 5) se realizó por medio de la técnica inmunoenzimática ELISA según las especificaciones del fabricante (CIVTEST, Laboratorios Hipra, S. A.). En el caso de las muestras sometidas al diagnóstico de *N. caninum* y el virus de la DVB, los resultados se expresaron como porcentajes de inhibición, donde el suero del bovino diluido se evaluó como negativo, si la lectura generaba un número menor a 50% de inhibición (punto de corte), bajo positivo, si era igual a 50% o menor a 80% y alto positivo igual o mayor a 80%. El ELISA indirecto utilizado para la identificación de anticuerpos contra el virus de la RIB se representa por el índice relativo (IRPC) de la muestra, donde un IRPC menor o igual a 20 se considera negativa y positiva mayor a este.

Para la estudio serológico de *B. abortus* se realizó la técnica de aglutinación en tarjeta (Anexo 6) y rivanol (Anexo 7) como prueba confirmatoria, tomando la dilución 1:50 en adelante como positiva (SAGARPA, 1997).

Los resultados obtenidos se registraron en una base de datos del programa Excell, para calcular los porcentajes de seropositividad. La presencia serológica simultánea de los agentes se realizó por medio de cuadros de contingencia y la prueba Chi cuadrado en el paquete estadístico SPSS versión 13.

Los datos correspondientes a la presentación de aborto de cada uno de los animales sometidos a prueba se recolectaron de los registros ganaderos al tiempo de muestreo, correspondiente a la etapa gestacional inmediata anterior. Estos, se analizaron y posteriormente se calculó la asociación entre la seropositividad a cada uno de los agentes y la presencia o ausencia de aborto (Daniel, 2002), mediante el paquete estadístico SPSS versión 13.

Resultados y discusión

El porcentaje de seropositividad a *N. caninum* en los establos sujetos a estudio se encuentra entre 42 y 72%, con un promedio total de 54.2% (Tabla 5), sin embargo, mayores valores de positividad se señalan en otras investigaciones similares (Morales et al., 2001^b; García-Vázquez et al., 2002, 2005) que reportan seroprevalencias que llegan incluso al 75% y a cerca del 100% en los hatos de las principales cuencas lecheras del país (Chihuahua, Durango, Coahuila, Aguascalientes, Querétaro y Jalisco), la variación en las cifras se ve influenciada tanto por las características propias de la región, como por el lapso de tiempo transcurrido entre los estudios.

En otros países, coincidentemente se publican seropositividades elevadas como en los Estados Unidos de América, específicamente en el estado de California, con prevalencias de 33 % en hatos lecheros (*Anderson et al., 1991*), al igual que el Estado de Quebec, Canadá (*Anderson et al., 2000*) Uruguay (*Furtado et al., 2011*) y en España donde se registran prevalencias que van de 28.8% hasta 60% en vacas lecheras (*Wu et al., 2002; Eiras et al., 2011*). Así mismo, en Egipto, se reportó un 20.43% de animales positivos al parásito (*Ibrahim et al., 2009*), y en Irán 46% (*Razmi et al., 2006*). Se considera de carácter emergente en países como Indonesia (*Made-Damriyasa et al., 2010*) y Japón (*Koiwai et al., 2006*). Contradictoriamente Suecia (*Bertels et al., 2006*) e Italia (*Otranto et al., 2002*) reportaron 0.5% y 11% respectivamente.

La neosporosis se presenta principalmente en ganado productor de leche manejado en confinamiento (*Eiras et al., 2011*) con presencia de humedad principalmente durante los meses de verano, como es el caso de la zona estudiada; esto, posibilita que oocistos expulsados al medio ambiente por el hospedador definitivo, esporulen y permanezcan en fase infectiva y viables en la tierra, suelos y pastos por varios meses (*Innes et al., 2005; Maley et al., 2006; Gibney et al., 2008*) lo que deviene en una vía de transmisión segura para el hospedero intermediario. Adicionalmente, se plantea la posibilidad de otros medios de transmisión como los mecánicos, sugeridos en el caso de *T. gondii*, parásito relacionado morfofisiológicamente (*Espinosa y Morales, 2007*).

La detección de anticuerpos anti-*Neospora* en los animales muestreados indican exposición al protozooario, bien sea por infección congénita, en la que algunas crías sobreviven, se desarrollan normalmente, y a la edad reproductiva lo transmiten verticalmente a su progenie, u horizontalmente por ingesta de ooquistes debida a la presencia de caninos infectados e identificados como hospedadores definitivos (Dubey y Schares, 2011), esto, desde la óptica epidemiológica posibilita el diseño de programas de control y prevención contra dicho parásito e incluso incidir en uno o más factores causales como son el ambiente, estrés, manejo, eliminación de perros, etc.

Los resultados del estudio serológico de *B. abortus* en la zona mencionada (Tabla 5), se corresponden con los reportados por otros autores (Gándara et al., 2001; Moreno, 2002) quienes refieren que existe alta prevalencia de anticuerpos en ganado lechero explotado en sistemas de manejo intensivos, con alta densidad en la población de zonas agrícolas del norte y centro de México, opuesto a los datos emitidos en países como Australia, Canadá y Estados Unidos donde la circulación del agente ha disminuido considerablemente en los últimos años o está erradicada (CEFIA, 2010; USDA, 2010; QH, 2011).

Los valores de cada uno de los establos con respecto a brucelosis (Tabla 5), representan desde el punto de vista epidemiológico, un reto, pues pese a la vacunación anual, las seropositividades resultaron elevadas, probablemente por la falta de pruebas serológicas periódicas y eliminación de reactores, lo que a su vez hará que las incidencias asciendan en cada uno de esos establos.

Si bien se dispone en México de dos presentaciones de la cepa vacunal 19 contra brucelosis, la dosis normal (5×10^{10} ufc) y la dosis reducida (3×10^8 a 10^9 ufc) que se aplica en hembras de 3 a 6 meses de edad y a mayores de 6 meses, respectivamente (SAGARPA, 1997); datos no publicados indican que los animales se vacunan indiscriminadamente cada seis meses y sin atender la dosis que le corresponde, aún cuando está contraindicado.

Tabla 5. Seropositividad a *Neospora caninum*, *Brucella abortus* y los virus de RIB y DVB en establos lecheros pertenecientes al Edo. de Hgo., México.

ESTABLO	Animales positivos/ total <i>Neospora caninum</i>	%	Animales positivos/ total <i>Brucella abortus</i>	%	Animales positivos/ total RIB	%	Animales positivos/ total DVB	%
1	21/50	42	19/50	38	18/50	36	21/50	42
2	27/50	54	23/50	46	21/50	42	26/50	52
3	23/50	46	18/50	36	13/50	26	22/50	44
4	29/50	58	27/50	54	19/50	38	27/50	54
5	28/50	56	14/50	28	16/50	32	23/50	46
6	36/50	72	19/50	38	20/50	40	29/50	58
7	32/50	64	22/50	44	19/50	38	25/50	50
8	26/50	52	21/50	42	18/50	36	23/50	46
9	22/50	44	16/50	32	17/50	34	20/50	40
10	27/50	54	19/50	38	15/50	30	27/50	54
Total seropositivos	271/500	54.2	198/500	39.6	176/500	35.2	243/500	48.6
Total seronegativos	229/500	45.8	302/500	60.4	324/500	64.8	257/500	51.4

Estos datos permiten, además, deducir que la presencia de *B. abortus* no es un problema especialmente de países con bajos recursos económicos, sino que depende, en gran medida, del compromiso del ganadero y del Estado para proceder con las buenas prácticas de manejo así como a la obligación de eliminar los animales positivos y de la realización de pruebas periódicas, no solo por el impacto económico en la industria pecuaria, sino por tratarse de un

agente de riesgo para el hombre, ya sea en el trabajo por el contacto con animales enfermos, o por el consumo de productos procedentes de animales infectados (*Sauret y Vilissova, 2002*).

La presencia simultánea de anticuerpos contra *N. caninum* y *B. abortus* del 21.2% (Tabla 6) se corresponde con otros reportes en Pakistán (*Shabbir et al., 2011; Zubair et al., 2011*), lo que manifiesta la necesidad de tener en cuenta la probabilidad de esta relación, considerando la similitud de ambos agentes en cuanto a la inducción de abortos, las condiciones en las cuales estos se difunden, y el manejo de la eliminación del material infeccioso, especialmente en establos como el número seis que presenta reactores de casi el doble con respecto a los otros establos (Tabla 6) y que representa un foco infeccioso.

En lo referente a las serologías virales, en cada uno de los establos las seropositividades fluctuaron entre 40 a 58% a DVB y de 26 a 42% a RIB. Esto arrojó un total de 48.6% de animales positivos a DVB y 35.2% a RIB (Tabla 5).

Estudios similares reportan seropositividades a DVB que van de 50-90% en algunos estados de la República Mexicana (*Moles et al., 2002; Solís-Calderón et al., 2005; Escamilla et al., 2007*), Perú (*Rivera, 2004*) y Argentina (*Odeón et al., 2001*). A pesar de que el virus de la DVB se considera como uno de los patógenos más ampliamente difundidos en la población bovina del mundo con tendencia a devenir endémica (*Lértora, 2003*), países tales como Suecia se declaran libres de DVB (*Wilke et al., 2003*), así mismo, Noruega, Finlandia y Dinamarca, desde 1995,

ejercen un plan de erradicación, mediante pruebas inmunoenzimáticas, eliminación de animales seropositivos, y examen serológico anual para mantener el estatus libre de la infección (*Bitsch et al., 2000*), además, Alemania sumó a estas estrategias la vacunación sistemática de las hembras, la educación e información de los productores y veterinarios para continuar con el programa (*Wilke et al., 2003*).

La considerable cantidad de animales seropositivos a DVB detectados, crea una alerta, inicialmente por ser ganado vacunado, esto, sugiere una evaluación de inmunidad de hato, ya que se reconoce que las vacunas inactivadas tienen la desventaja de estimular una débil respuesta de anticuerpos neutralizantes y por lo tanto la duración de protección es menor, lo que indica la necesidad de aumentar la frecuencia de administración, además, con este tipo de vacuna, no se logra evitar el pasaje viral de la madre al feto en cualquier período de la gestación (*Gogorza et al., 2001*).

Adicionalmente, se conoce que el virus se localiza en el tejido linfoide, principalmente en macrófagos y linfocitos de tonsilas, en las placas de Peyer, las cuáles constituyen las células blanco de la replicación viral, lo que genera una serie de factores inmunosupresores (*Melo et al., 2004; Givens et al., 2007*) como la reducción de la quimiotaxis, supresión de las respuestas proliferativas de células mononucleares bovinas, alteración de la función neutrofílica, al nivel de disminuir su capacidad de degranulación (*Mineo et al., 2006; Konnai et al., 2008*), así mismo, decrece la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la

liberación de un inhibidor de la actividad de las IL-1, esenciales para el normal desarrollo y maduración de linfocitos (Tizard, 2002), estos efectos, pueden facilitar el ingreso de otros microorganismos coinfectantes (Houe, 2003; Givens et al., 2007) o aumentar la severidad de estos. No obstante, el sistema inmune se estimula aunque la respuesta linfocitaria de memoria esté disminuida, por lo que no es de extrañar la simultaneidad serológica del virus de la DVB y el parásito mostrada en el presente estudio (33.6%) (Tabla 6) y en otros trabajos similares (Björkman et al., 2000; Mc Allister y Latham, 2002), sin embargo, investigadores de Australia (He et al., 2004) y Brasil (Melo et al., 2004), en base a sus resultados, discrepan al respecto.

Tabla 6. Asociación serológica de *N. caninum* con otros agentes infecciosos en 500 vacas lecheras pertenecientes a Hgo., México.

ESTABLO	NEOS*-BR**	NEOS-RIB	NEOS-DVB	NEOS-BR-RIB	NEOS-BR-DVB	NEOS-DVB-RIB
1	9	17	14	9	8	13
2	10	19	13	10	9	11
3	9	10	11	7	8	10
4	12	14	16	9	11	12
5	9	13	15	7	8	10
6	20	19	24	16	18	17
7	12	17	22	6	7	14
8	8	16	20	8	10	12
9	9	15	19	6	8	9
10	8	13	14	7	7	9
Número de seropositivos	106	153	168	85	94	117
Porcentaje de seropositivos	21.2	30.6	33.6	17	18.8	23.4

**Neospora caninum*

** *Brucella abortus*

Así mismo, es necesario enfatizar que las elevadas seropositividades obtenidas en los establos, principalmente el seis, siete y ocho muestran lo fundamental que es el contar programas integrales de manejo y medicina veterinaria

preventiva de acuerdo a las características de cada uno de los establos, lo que los posibilitará a elevar su estado sanitario y optimizar el rendimiento de las explotaciones (*Thrusfield, 2007*).

Se cree que la RIB es una enfermedad ampliamente distribuida en México, pues estudios de Yucatán y Michoacán en ganado bovino criado en zonas sin antecedentes de vacunación notifican seroprevalencias de 22 a 54.4% (*Solis-Calderón et al., 2003; Magaña-Urbina et al., 2005*), otros países en condiciones similares, como Turquía (*Tolga et al., 2006*) y Perú (*Rivera et al., 2004*) reportan seropositividades de 19.5% y 46.3%, cercano al porcentaje de animales seroreactores en el presente trabajo (35.2%) (Tabla 5), sin embargo, a diferencia de estos, el ganado sujeto a estudio se inmunizó con virus inactivado 10 meses previo al muestreo serológico, lo que en este caso puede indicar la posibilidad de protección deficiente o en descenso, así como circulación viral en los establos y la consecuente exposición de los animales al agente, favorecido por el hacinamiento, introducción de animales infectados y mezcla de animales que permiten la diseminación del microorganismo, condiciones comúnmente asociadas a un mayor riesgo a RIB (*Favoreel et al., 2000*).

Sumado a ello, en el presente trabajo se observó que *N. caninum* y RIB, coexisten serológicamente en un 30.6% con un promedio aproximado de 15 animales seroreactores a ambos agentes en cada uno de los establos (Tabla 6). Dadas las pérdidas que ocasionan estos agentes y la situación que se evidencia, la aplicación de medidas de prevención y control son importantes ya

que de lo contrario devienen en una fuente de infección para animales susceptibles (*Tolga et al., 2006*).

La serología simultánea se mantiene aún elevada al relacionar los resultados hasta en tres entidades (Tabla 6), pero cabe nuevamente destacar aquella relacionada con *N. caninum*, DVB e IBR. Un aspecto importante de la infección con el virus de la DVB es su afinidad por el sistema inmune, principalmente sobre células mitóticamente activas como los linfocitos, de manera que una de sus principales características es la inmunosupresión (*Baule et al., 2001; Melo et al., 2004*) y la infección mixta o secundaria con otros patógenos es de presentación común, en este caso, básicamente por un fenómeno de reactivación del parásito y del virus mencionados, por lo que la sinergia entre ellos es posible (*McAllister y Latham, 2002; Rivera et al., 2004; Givens et al., 2007*).

En otra vertiente, los resultados arrojaron un porcentaje de abortos total de 34.6% sobre los animales sometidos a prueba en los 10 establos del estado de Hidalgo, México, este número sobrepasa el 10% marcado y establecido como límite aceptable (*Rivera, 2004*), a lo que se suma la consideración que de persistir por varios años un porcentaje mayor al 5% anual, los abortos deben considerarse endémicos (*Anderson et al., 2000*), creando además, la necesidad de identificación de las causas que lo producen, para un adecuado control. Esto, sin duda, genera un gran desafío para el veterinario y el ganadero debido a la múltiple etiología y características propias del proceso patológico; sin embargo, el método diagnóstico ELISA, utilizado en el presente trabajo, incrementan la sensibilidad y especificidad al emplear anticuerpos monoclonales, además,

resultan una herramienta útil para identificar animales infectados, que como en el caso de *N. caninum* no pueden ser asociados directamente a la tasa de abortos, pero sí pueden indicar exposición al protozooario y por ende la probabilidad de abortar (Waldner, 2005; Weston et al., 2005; Simsek et al., 2008).

Estudios llevados a cabo en Eslovaquia y China reportan respectivamente 20% y 22.7% de animales seropositivos a *N. caninum* con antecedentes de abortos (Reiterová et al., 2009; Xia et al., 2011), porcentaje cercano al 26% obtenido en el norte, centro de México (García-Vázquez et al., 2005) y en el presente trabajo (Tabla 7), sin embargo, el mismo autor reporta en Aguascalientes, México 69% (García-Vázquez et al., 2002; Gutiérrez et al., 2007), de manera similar, se reportan evidencias serológicas en países americanos como Venezuela (Obando et al., 2010) Chile (Alacid, 2001) y Ecuador (Lozada 2004) con valores de 54, 62.2 y 71.8% respectivamente.

Se encontró que las vacas seropositivas a *N. caninum* que presentaron aborto pueden tener 4.16 veces mayor riesgo de aborto en las gestaciones subsiguientes que las seronegativas ($p \leq 0.001$) (Tabla 7), cifra que se encuentra en los límites inferiores de aquellas vertidas por diversos autores que van de 2.5 (Williams et al., 2003; Corbellini et al., 2006) a 19 (López-Gatius et al., 2004; Beck et al., 2010). De manera controvertida algunos estudios indican que una vaca que aborta por *Neospora* tiene menor riesgo de abortar en su siguiente gestación por ese agente, pero quizá este comportamiento se explique por la eliminación selectiva de las vacas que abortan en un predio (Anderson et al., 2000; Innes et al., 2001).

Aún cuando existe una vacuna inactivada contra este parásito, no existe información concluyente respecto a su eficacia para reducir la infección fetal o para prevenir la infección post natal en vacas no infectadas (*Anderson et al., 2000*). Sin embargo, estudios preliminares indican que la vacuna tiene la capacidad de reducir la incidencia de abortos, pero no genera protección contra la transmisión vertical del parásito (*Estill, 2004*), por lo que se evidencia su trascendencia desde el punto de vista epidemiológico (*Trees y Williams, 2005*).

La asociación con respecto a la seropositividad al virus de la DVB y la presencia de aborto resultó elevada (25%) (Tabla 7) y, superada hasta en un 54% por trabajos publicados de Valdivia, Chile (*Alacid, 2001*) y del Valle de Lima, Perú (*Rivera, 2004*). En este punto es importante destacar que el efecto del virus de la DVB sobre el producto de la concepción depende del biotipo viral infectivo y del período de gestación de la vaca que puede conllevar la muerte del feto con expulsión o momificación (*Lértora, 2003; Niskanen y Lindberg, 2003*); por otro lado, la infección por el virus de la DVB en hembras seronegativas durante el primer tercio de la gestación puede provocar el nacimiento de terneros persistentemente infectados (PI). Una elevada proporción de hembras PI (24%) llega a la edad reproductiva, que darán origen a la presencia de abortos o terneros PI. Un becerro recién nacido PI es capaz de diseminar la enfermedad hasta en un 90% a los otros animales en un periodo de 3 meses (*Houe, 2003; Solis-Calderón et al., 2005*) si los animales se encuentran en un sistema de confinamiento en estrecho contacto (*Morán et al., 2006*).

De igual manera, es de considerar, la posibilidad de ocurrencia de aborto aún en animales vacunados contra el virus (*Trees y Williams, 2005*), no obstante que en el caso del virus de la DVB no se indica la proporción de ellos, como los calculados en la vacunación contra *B. abortus* cepa 19 y RB51 donde la falta de protección del producto se manifiesta entre un 0.1 y 0.01% respectivamente (*SAGARPA, 1997*); sin embargo y a pesar de su relación con el aborto, los datos son escasos, probablemente por las campañas y la vigilancia epidemiológica que se llevan a cabo en los distintos países como en Chile, Holanda o Estados Unidos que informan 3.5%, 0% o se reportan como países libres de la enfermedad respectivamente (*Alacid, 2001; USDA, 2010*). México, por su parte, se encuentra con la mayoría de los Estados en fase de control, por lo que no es de sorprender el 18.2% obtenido en el presente trabajo (Tabla 7).

Tabla 7. Número de animales seropositivos a *Neospora caninum*, *Brucella abortus*, y a los virus de la RIB y DVB en relación al aborto.

	<i>Neospora caninum</i>	<i>Brucella abortus</i>	RIB	DVB
Número de seropositivos/aborto (%)	131 (26.2)	91 (18.2)	89 (17.8)	125 (25)
Razón de riesgo (Odds ratio)	4.16	2.28	2.92	4.61

El virus HVB-1, que produce la RIB es conocido por su capacidad de ocasionar aborto debido a secuelas del problema respiratorio, produciendo brotes hasta en un 25% (*León y Villamil, 2002*). Los resultados evidenciaron un 17.8% de animales positivos a RIB con historia de aborto (Tabla 7), porcentaje superado por estudios en Perú (27%) (*Rivera, 2004*), Eslovaquia (41.5%) (*Reiterová et al., 2009*) y Chile (50%) (*Alacid, 2001*).

Al asociar el número de vacas seropositivas a *N. caninum* y al virus de la DVB que presentaron aborto, los datos se incrementaron a 5 veces el riesgo de abortar (Tabla 8), de manera semejante Häsig y Gottstein (2002) y Mineo *et al.*, (2006) indicaron que esto ocurrió con mayor frecuencia en rodeos que presentaron niveles mayores de anticuerpos contra el virus de la diarrea vírica bovina. Lo indiscutible es que el virus de la DVB juega un importante papel como inmunosupresor, favoreciendo el desarrollo de infecciones secundarias (Njaa *et al.*, 2000; Bolin y Grooms, 2004). Bajo este contexto se afirma que provoca la reactivación del parásito favorecida, además, por los cambios en el sistema inmunitario en la mitad de la gestación, consistente en una baja regulación de la respuesta celular, incluyendo INF γ , como efecto del incremento de los estrógenos placentarios y el descenso de la progesterona que favorecen la transmisión vertical del parásito a su descendencia, pues generalmente, un 8% de las gestaciones entre los 30 y 90 días se pierden sin guardar relación con el número de partos o el nivel de producción, pero sí con niveles alterados de progesterona y estradiol (Campero *et al.*, 2003; Bartley *et al.*, 2004).

Tabla 8. Interrelación de animales seropositivos a *Neospora caninum*, *Brucella abortus*, y a los virus de la RIB y DVB en relación al aborto.

<i>Número de seropositivos a</i>	NEOS-BR (%)	NEOS-RIB (%)	NEOS-DVB (%)
<i>Presencia de aborto</i>	65 (26.74)	64 (17.82)	97 (30.12)
<i>Razón de riesgo (Odds ratio)</i>	4.13	4.38	5.0

Los resultados con respecto a la vinculación del virus de la RIB o de *B. abortus* con *N. caninum* muestran porcentajes superiores al 15% (Tabla 8) cifras que indican la posibilidad de esta asociación, al ser agentes con gran tropismo por las membranas fetales, con consecuencias fatales para el feto (*Blood et al., 1992*). Además, los análisis serológicos exhibieron 51 (10.2%) animales que reaccionaron simultáneamente a *Neospora caninum* y los virus de la RIB y DVB, superior a las relaciones de *Neospora caninum* con *Brucella abortus* - RIB (6.8%) y *Brucella abortus* - DVB (8.6%).

La elevada coexistencia serológica del parásito con otros agentes causantes de la pérdida del producto de la concepción en la población estudiada, sustenta por primera vez en la zona, la necesidad de contar con un programa de manejo de hato en el que se incluya entre otros, la vigilancia en el ingreso de nuevos animales y densidad de hato, serologías periódicas, calendario de vacunación y evaluación de la misma, de manera que se reduzcan las posibles pérdidas económicas por merma en la producción y reproducción en su unidad de producción y por otro será el punto de partida para concientizar y ejercer un diagnóstico completo de la causa de aborto bovino así como el de identificar los factores concomitantes.

La ganadería lechera en el estado de Hidalgo, Méx., sostiene una situación difícil, pues por un lado, la demanda lechera nacional es cada vez mayor, y por otro el precio no logra cubrir la inversión por litro de leche producida. Bajo este panorama, los ganaderos prefieren cerrar a cambiar, entre otras cosas sus

procedimientos de manejo e higiene (*Romero et al., 2009*). No obstante, las medidas de control expresadas anteriormente, no requieren gran inversión, pero a futuro logran en gran medida disminuir las pérdidas ocasionadas por *N. caninum*.

5.3 Experimento 3. Pérdidas económicas en base a la probabilidad de ocurrencia de aborto por *N. caninum* en ganado bovino lechero de Hidalgo, México.

Introducción

Con el propósito de realizar valoraciones sobre el impacto económico de la neosporosis, se han adoptado y adaptado medios estadísticos como los modelos estocásticos (*Bartels et al., 2006*), o el modelo estadístico administrativo parcial (*Weersink et al., 2002*), pese a que en ganado lechero las pérdidas postnatales a causa de la neosporosis son difíciles de estimar, debido a que en los animales adultos, excluyendo el aborto, la infección es asintomática. No obstante, se pueden tomar en cuenta costos asociados al aborto como compra de reemplazos, posible pérdida de producción de leche, alimentación, atención médica, entre otros (*Hobson et al., 2002*).

En México no se han estimado las mermas económicas básicamente por la falta de datos, principalmente en lo referente a la vinculación de la serología positiva a *N. caninum* con el aborto en la zona de estudio. Por lo anterior, y en base al resultado obtenido en el experimento 2, nuestro objetivo se orientó a cuantificar las pérdidas económicas, sobre la base de la razón de riesgo de aborto por *N. caninum* en ganado bovino lechero del estado de Hidalgo, México.

Materiales y métodos

Para estimar las pérdidas económicas por *N. caninum* asociadas a los abortos, se desarrolló un modelo estadístico administrativo parcial adaptado de Bennett., *et al* (1999).

El diseño incluyó características de los establos, cuyos datos se extrajeron de los resultados obtenidos en el experimento 2, y de los registros ganaderos (Tabla 9), posteriormente utilizados para calcular las pérdidas directas por producción de leche, sacrificio prematuro, mortalidad, aborto y servicios veterinarios (Tabla 10).

Con el fin de evaluar los costos por merma en la producción de leche (Tabla 10 sección a) se multiplicó el promedio de producción de leche/vaca/año (y), el precio por litro de leche (p_l), el promedio de animales por establo (n) por la prevalencia de la infección en el establo (d_i) y el porcentaje en la reducción de la producción de leche (y_l^d).

Respecto al costo por sacrificio (Tabla 10 sección b), se calculó multiplicando el promedio de animales por establo (n), y la prevalencia de la infección (d_i), por el porcentaje de los animales infectados sacrificados (c_i^d). El resultado, a su vez se multiplicó por el costo de reemplazo debido al sacrificio prematuro de una vaca [$r-s (1- s_i^d)$].

Los abortos y las pérdidas reproductivas (Tabla 10 sección d) se estimaron multiplicando el número de vacas seropositivas (d_i) a *N. caninum* que abortaron (a_i^d) en un establo (n) por el valor en pérdidas reproductivas (a).

Tabla 9. Datos para estimar pérdidas económicas por *N. caninum* en el ganado bovino lechero de Hgo. México.

Característica	Valor
Población total (N)	25,000**
Número total de establos (H)	86**
Promedio de animales por establo (n)	300**
Promedio de producción de leche/vaca/año (y)	6,862**
Precio por litro de leche (p_l)	\$4.70**
Costo por reemplazo de una vaca (r)	\$26,000.00**
Valor de sacrificio de animal sano (s)	\$10,000.00**
Valor de una vaquilla (c)	\$4,000.00**
Valor de una vaca (h)	\$14,400.00**
Costo por visita de veterinario (v)	\$500.00**
Costo de medicamentos (m)	\$300.00**
Costo por labor extra veterinaria/cabeza (l)	\$20.00**
Prevalencia de la infección (d_i)	54.2%*
Proporción de establos infectados (r_d)	100%*
Porcentaje de abortos vinculados a <i>N. caninum</i> (a_i^d)	26.2%*

*Datos obtenidos de los resultados del experimento 2

**Datos extraídos de los registros ganaderos

Para obtener las pérdidas directas totales (L) por *N. caninum* se sumaron las cuatro secciones anteriores (a)Producción de leche + b)Sacrificio + c)Mortalidad + d)Pérdidas por aborto) (Tabla 10).

Finalmente, los costos por servicios veterinarios (V) incluyeron:

- visitas para diagnóstico clínico, que se calculó multiplicando el número de animales infectados ($n \cdot d_i$) por el costo de la visita médica (v), en proporción a los animales que abortaron y aquellos que murieron por esa enfermedad ($a_i^d + m_i^d$);
- costo de medicamentos expresada como el número de animales infectados ($n \cdot d_i$) por el costo del medicamento (m) y la proporción de animales que requieren el medicamento $2(a_i^d + m_i^d)$ y

- costos por labor extra, la cual se obtuvo, multiplicando número de animales infectados ($n \cdot d_i$) por el costo de labor extra (v) en proporción a los animales que requieren medicación $2(a_i^d + m_i^d)$.

Los cálculos a nivel de establo por año se obtuvieron sumando las pérdidas directas totales (L) y los costos de servicios veterinarios totales (V).

Tabla 10. Hoja de cálculo para estimar pérdidas económicas directas por *N. caninum* en el ganado bovino lechero de Hgo. México.

PÉRDIDAS DIRECTAS	Fórmula
a)Producción de leche	
Porcentaje en la reducción de la producción de leche (y_i^d)	
Costos por pérdida de leche	$y \cdot p_i \cdot n \cdot d_i \cdot y_i^d$
b)Sacrificio	
Porcentaje de animales infectados sacrificados (c_i^d)	
Valor reducido de sacrificio (s_i^d)	
Costo por sacrificio prematuro	$n \cdot d_i \cdot c_i^d \cdot [r - s \cdot (1 - s_i^d)]$
c)Mortalidad	
Porcentaje de mortalidad (m_i^d)	
d)Pérdidas por aborto	
Porcentaje de aborto en ganado infectado(a_i^d)	
Pérdida de producción de leche por aborto (y_i^d)	
Valor por pérdidas reproductivas (a)	$y \cdot p_i \cdot y_i^d \cdot c$
Pérdidas por aborto	$(n \cdot d_i \cdot a_i^d) a$
Pérdidas directas totales (L)	
COSTOS DE SERVICIOS VETERINARIOS	
a)Servicios veterinarios	$(n \cdot d_i) (a_i^d + m_i^d) v$
b)Costos por medicamentos	$(n \cdot d_i) \cdot 2(a_i^d + m_i^d) m$
c)Costos por labor extra	$(n \cdot d_i) \cdot 2(a_i^d + m_i^d) l$
Costos de servicios veterinarios totales (V)	
Pérdidas económicas a nivel de establo	L + V
Pérdida económica por pérdida de la gestación	

Resultados y discusión

Sobre la base de los datos expresados en la tabla 9 y la aplicación de las fórmulas de la tabla 10, la merma con respecto a la producción de leche resulta un tanto cuestionable, pues se describen resultados contradictorios, unos aseguran haber obtenido un aumento en la producción en vacas seropositivas (Pfeiffer *et al.*, 2002), en tanto Hernández *et al.*, (2001) y Häsler *et al.*, (2006) señalan decremento del 3-4% de la producción. Lo que puede resultar cierto, es que la baja en la producción se deba más a la presencia del aborto que a la seropositividad (Hobson *et al.*, 2002). El presente trabajo determinó un promedio de 3.5 % por concepto de reducción en la producción de leche (Tabla 11 sección a).

En los establos sujetos a estudio no se tienen datos específicos acerca del porcentaje de animales infectados sacrificados (c_i^d) o del valor reducido al sacrificio por causa de neosporosis (s_i^d), por ello, se tomó de referencia el estudio llevado a cabo en California (Thurmond y Hietala, 1996) sobre el sacrificio de ganado bovino lechero en el transcurso de tres años (2%) (Tabla 11 sección b). Al no haber antecedentes en cuanto a la muerte de bovinos adultos por *N. caninum*, a excepción de los nacimientos de terneros a término con lesiones especialmente nerviosas que mueren aproximadamente entre los 90 y 180 días post parto (Anderson *et al.*, 1997; Helman *et al.*, 1998; Hietala y Thurmond, 1999) el porcentaje de mortalidad que se asignó fue de cero.

Tabla 11. Pérdidas económicas directas por *N. caninum* en el ganado bovino lechero de Hgo. México.

PÉRDIDAS DIRECTAS	Resultado
a)Producción de leche	
Porcentaje en la reducción de la producción de leche (y_l^d)	3.5%
Costos por pérdida de leche	183,542.71
b)Sacrificio	
Porcentaje de animales infectados sacrificados (c_l^d)	2%
Valor reducido de sacrificio (s_l^d)	0%
Costo por sacrificio prematuro	\$52,032.00
c)Mortalidad	
Porcentaje de mortalidad (m_l^d)	0%
d)Pérdidas por aborto	
Porcentaje de aborto en ganado infectado(a_l^d)	26.2%
Pérdida de producción de leche por aborto (y_l^d)	28%
Valor por pérdidas reproductivas (a)	\$ 13,030.40
Pérdidas por aborto	\$555,100.00
Pérdidas directas totales (L)	\$803,705.11
 COSTOS DE SERVICIOS VETERINARIOS	
a)Servicios veterinarios	\$21,300.60
b)Costos por medicamentos	\$25,560.72
c)Costos por labor extra	\$1,704.04
Costos de servicios veterinarios totales (V)	\$48,565.36
 Pérdidas económicas a nivel de establo	\$852,270.47
	U.S.\$65,559.26
 Pérdida económica por pérdida de la gestación	\$6,505.88
	U.S.\$500.45

Como se puede observar en la Tabla 11, el mayor impacto corresponde a las pérdidas por aborto en animales serológicamente positivos a *N. caninum*, que ascienden a \$555,100.00, lo que no es de extrañar, pues existen reportes similares que indican altos valores (Lozada, 2004; García-Vázquez et al., 2005; Reiterová et al., 2009; Xia et al., 2011). Adicionalmente se afirma que el 43.8% de las vacas que abortan por primera vez, lo vuelven a hacer, sin definir si la infección se origina de los quistes existentes en ellas o si se debe a una reinfección (Obendorf et al., 1995). Moen et al., (1998) y Pérez et al., (1998) por su parte informan

que bovinos infectados con *N. caninum* tienen de 3-5 o hasta 12 veces mayor riesgo de abortar que aquellos no infectados, coincidente con lo obtenido en el experimento 2 (Odds ratio 4.16), lo que probablemente se puede reflejar en mayores pérdidas, sobre todo si se mantienen estos animales dentro del establo.

Los costos por servicios veterinarios (v) fueron de \$48,565.36. En este punto es importante resaltar el bajo costo de honorarios médicos en México que se calculan en U.S. \$41.00 por día, en tanto que en otros países se reportan hasta U.S. \$100.00 por hora por animal infectado. Y no decir del costo por labor extra, donde las cifras en el extranjero se triplican (*Bartels et al., 2006*) (Tabla 11).

Por caso, el costo por pérdida de la preñez (aborto) se calculó en \$6,505.88 (U.S.\$500.45), monto cercano a los indicados en otros trabajos que van de U.S.\$600.00 (*Peter, 2000; Eicker y Fetrow, 2003*) hasta U.S.\$1,200.00 (*Anderson et al., 2000; Weersink et al., 2002*). De esta manera, el total de pérdidas estimadas a nivel de establo por año en este estudio fueron de \$852,270.47 (U.S.\$65,559.26).

El elevado costo por pérdida de la preñez y las pérdidas estimadas a nivel de establo por año evaluadas sobre la base de la razón de riesgo de aborto por *N. caninum* en ganado bovino lechero del estado de Hidalgo, México, son de utilidad en el análisis costo – beneficio de la neosporosis en los establos, con el objeto de que se tomen decisiones correctas al implementar medidas de control y/o prevención, tanto, como en el manejo reproductivo; más aún cuando la

vinculación de la seropositividad de los animales (54.2%) con el aborto resultó en un 26.2%, lo que en caso contrario generará mayores pérdidas.

6. CONCLUSIONES GENERALES

6. CONCLUSIONES GENERALES

1. Se demostró a través de la evaluación histopatológica la presencia de *N. caninum* en un 40% de los cerebros fetales abortados y recuperados, donde se identificaron quistes tisulares del protozoo (8.57%), necrosis (25.71%) y células mononucleares (22.85%). En tanto, 5 de las 10 muestras positivas por histopatología ofrecieron resultados positivos a través de PCRtr.
2. Se obtuvo seropositividad del 54.2% a *N. caninum* en hembras bovinas pertenecientes al Edo. de Hidalgo, México y coexistencia serológica con *B. abortus* y los virus de la RIB y DVB en 21.2%, 30.6% y 33.6% respectivamente.
3. Se encontró relación altamente significativa ($p \leq 0.001$) entre la seropositividad del parásito y los eventos abortivos inmediatos anteriores al muestreo (Odds ratio 4.16) y coexistencia serológica entre el protozoo y otros agentes en los casos de aborto, siendo la más significativa la correspondiente a *N. caninum* –DVB con un 30.12% (Odds ratio 5.0).
4. Se mostró que *N. caninum* es causante de pérdidas económicas por \$852,270.47 (U.S.\$65,559.26) a nivel de establo y por pérdida de la gestación \$6,505.88 (U.S.\$500.45).

7. RECOMENDACIONES

7. RECOMENDACIONES

1. Ampliar monitoreos serológicos periódicos y posterior pesquisa para determinar la participación de *N. caninum* en la reproducción de bovinos de la zona, particularmente con la técnica inmunoenzimática (ELISA)
2. Aplicar métodos moleculares en caso de animales con valor genético.
3. Establecer medidas de control contra el protozoo, donde la eliminación del hospedero definitivo sea un aspecto primario, junto con medidas zootécnicas y sanitarias.
4. Investigar el papel que juegan los humanos, ratas o animales silvestres en el ciclo biológico del parásito.
5. Contemplar otros factores inmunosupresores que permitan la colonización parasitaria.
6. Profundizar en las investigaciones de la vacuna de *N. caninum*, con vistas a una mejor aplicación de la misma.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alacid, M. 2001. Descripción epidemiológica del Síndrome Abortivo Bovino en rebaños sometidos a monitoreo por el Servicio Agrícola y Ganadero en ocho comunas de la Provincia de Valdivia, período 1999-2001. *Memoria de título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Almeria, S., T. De Marez, H. Dawson, R. Aaraujo, J. P. Dubey y L. C. Gasbarre. 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25:383-392.

Aly, N.M., G. G. Shehab y I. H. A. Abd El-Rahim. 2003. Bovine viral diarrhoea, bovine herpesvirus and parainfluenza-3 virus infection in three cattle herds in Egypt in 2000. *Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz.* 22(3):879-892.

Anderson, M.L., P. C. Blanchard, B. C. Barr, J. P. Dubey, R. L. Hoffman y P. A. Conrad. 1991. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198:241-244.

Anderson, M.L., B.C. Barr y P.A. Conrad. 1994. Protozoal causes of reproductive in domestic ruminants. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 10:439-461.

Anderson, M.L., J. P. Reynolds, J. D. Rowe, A. E. Packham, B. C. Barr y P. A. Conrad. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210:1169-1172.

Anderson, M, L., A. G. Andrianarivo y P. A. Conrad. 2000. Neosporosis in cattle. *An. Reprod. Sci.* 60-61:417-431.

Andrianarivo AG, J. D. Rowe, B. C. Barr, M. L. Anderson, A. E. Packham, K. W. Sverlow, L. Choromanski, C. Loui, A. Grace y P.A. Conrad. 2000. A POLYGEN –adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Inter. J. Parasitol.* 30:985-990.

Andrighetto, I. y S. Nardelli. 2006. How to combat two causes of low fertility (bovine diarrhea virus and *Neospora caninum*). *Inf. Agr.* 62(4):111-114.

Andrianarivo AG, B. C. Barr, M. L. Anderson, J. D. Rowe, A. E. Packham, K. W. Sverlow y P. A. Conrad. 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 87:817-825.

Ansari-Lari, M., S. Motlagh, M. Moravveji, S. Bahrami y A. Hosseini. 2011. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in dairy cattle, Iran. *J. Vet. Res.* 15(2):155-161.

- Babiuk, L., L. Van Drunen y S. Tikoo. 1996. Immunology of bovine herpesvirus 1 infection. *Vet. Microbiol.* 53:31-42.
- Baldone, V. N., L. I. Fuchs, M. C. Rojas, M. C. Fort, C. Venturini y H. D. Giménez. 2009. Neosporosis y toxoplasmosis en la liebre europea (*Lepus europaeus*) en la provincia de La Pampa (Argentina). *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 43(4):633-636.
- Barr, B.C., M.L. Anderson, K.W. Sverlow y P.C. Conrad. 1995. Diagnosis of bovine fetal Neospora infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.* 137:611-613.
- Barr, C., I. Bjerkas, D. Buxton, P. A. Conrad, J. P. Dubey, J. T. Ellis, M. C. Jenkins, S. A. Johnston, D. S. Lindsay, L. D. Sibley, A. J. Trees y W. Wouda. 1997. Neosporosis, Report of International Neospora Workshop. *Comp. Con. Educ.* 19:120-126.
- Barta, J. R. y J. P. Dubey. 1992. Characterization of anti-*Neospora caninum* hipperimmune rabbit serum by Western-blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitol. Res.* 78:689-694.
- Bartels, C. J. M., H. Hogeveen, G. Van Schaik, W. Wouda y Th. Dijkstra. 2006. Estimated economic losses due to *Neospora caninum* Infection in dairy herds with and without a history of *Neospora caninum* associated abortion epidemics. *Proceedings of the 11th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics.*
- Bartley, P. M., E. Kirvar, S. Wright, C. Swales, I. Esteban-Redondo, D. Buxton, S. W. Maley, A. Schock, A. G. Rae y C. Hamilton. 2004. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at midgestation. *J. Comp. Path.* 130:81-91.
- Baszler, T., V. Lawrence, J. C. Gay, M. T. Long y B. A. Mathison. 1999. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J. Clin. Microbiol.* 37(12):4059-4064.
- Baule, C., G. Kulcsar, K. Belák, M. Albert, C. Mittelhlzer, T. Sooz, L. Kucsera y S. Belák. 2001. Pathogenesis of primary respiratory disease induced by isolates from a new genetic cluster of Bovine Viral Diarrhoea virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 39:146-153.
- Beck, R., A. Marinculic', Z. Mihaljevic', M. Benic' y F. Martinkovic. 2010. Seroprevalence and potential risk factors of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Croatia. *Vet. Arhiv.* 80(2):163-171.
- Beers. M. H., R. S. Porter, T. V. Jones, J. L. Kaplan, y M. Berkwits. 2006. Manual Merck de diagnóstico y terapéutica. Ed. Elsevier. 18⁰. edición.
- Bennett, R.M., K. Christiansen y R. S. Clifton-Hadley 1999. Modelling the impact of livestock diseases on production: case studies of non-notifiable diseases of farm animals in Great Britain. *Anim. Sci.* 68:681-689.
- Bertels, C. J. M. J. I. Arnaiz-Seco, A. Ruíz-Santa, C. Björkman, I. W. Wouda y L. M. Ortega-Mora. 2006. Supranational comparison of *N. caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherland, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol.* 137(1-2):17-27.
- Bidfel, B. C., J. Davidson y J. P. Dubey. 1994. Neospora induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. *Can. Vet.* 35(2):122-123.

Bitsch, V., K. Hansen y L. Ronsholt. 2000. Experiences from the Danish programme for eradication of Bovine Diarrhoea Virus (BVD) 1994-1998 with the special emphasis to legislation and causes of infection. *Vet. Microbiol.* 77:137-143.

Bjerkas, I., S. F. Mohn y J. Presthus. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70:271-274.

Björkman, C. y A. Uggla. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 29:1497-1507.

Björkman, C., S. Alenius, U. Emanuelsson y A. Uggla. 2000. *Neospora caninum* and Bovine Virus Diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet. J.* 159:201-206.

Blood D., J. Henderson y D. Radostis. 1992. Medicina veterinaria. España. Editorial Interamericana de España Mc Graw Hill.

Bolin, S.R. y D. L. Grooms. 2004. Origination and consequences of Bovine Viral Diarrhea virus diversity. *Vet. Clin. Food Anim.* 20(1):51-68.

Brittain, R. 2000. A review of current reports on bovine neosporosis. *Associattion Europenne Transfer Embryonnaire Newsletter.* 11:8-10.

Buxton, D., M. McAllister y J. P. Dubey. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 18:546-552.

Cabral, A. D.; C. N. Camargo; N. T. Galleti; L. H. Okuda; E. M. Pituco; C. Fava. 2009. Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 18 (4) 14-19.

Campero, C. M., D. P. Moore, M. A. Anderson, M. A. Posso. 2000. Diagnóstico de aborto bovino a *Neospora caninum* mediante inmunohistoquímica en rodeos de Argentina. Memorias del XXI Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este, Uruguay, p. 95.

Campero, C.M., D. P. Moore, A. C. Odeon, A. L. Cipolla y E. Odriozola. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet. Res. Commun.* 27:359-369.

Carvalho, J. V., C. S. Alves, M. D. Cardoso, C. M. Mota, B. F. Barbosa, E. V. Ferro y D. O. Silva. 2010. Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 40(14):1629-1637.

CEFIA. 2010. Canadian Food Inspection Agency. Accredited Veterinarian Program.

Chase, C., L. Braun, J. Jessen, y D. Hurley. 1995. Studying virus cell interactions: finding new ways to prevent infectious bovine rhinotracheitis in cattle. *Departments of Veterinary Science and Biology/Microbiology.*

Chen, L., Q. Liu, F. Yang, W. Cao y B. Chahan. 2011. Application of an indirect rELISA kit for the detection of antibody against *Neospora caninum*. *Xinjiang Agri. Sci.* 48(5):942-947.

Chi, J., J. A. VanLeeuwen, A. Weersink, A. y G. P. Keefe. 2002. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. *Prev. Vet. Med.* 55:137-153.

Collantes-Fernández E., L. Ortega-Mora. 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 111: 143-152.

Conzuelo S. R., L. Medina-Esparza, P. M. Ramos, Z. García-Vázquez y C. Cruz-Vázquez. 2011. Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 2(1):15-24.

Corbellini, L. G., D. Driemeier, C. F. E. Cruz, L. F. P. Gondim y V. Wald. 2002. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 103:195–202.

Corbellini, L. G., C. A. Pescador, F. Frantz, E. Wunder, D. Steffen, D. R. Smith y D. Driemeier. 2006. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *Vet. J.* 172:114-120.

Daniel, W. 2002. Bioestadística: base para el análisis de las ciencias de la salud. Ed. Limusa. 4ª. edición. México.

Davison, H. C., C. S. Guy, J. W. McGarry, F. Guy, D. J. L. Williams, D. F. Kelly y A. J. Trees. 2001. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res. Vet. Sci.* 70:163-168.

Dion, S., S. Germon, R. Guiton, C. Ducournau, I. Dimier-Poisson. 2011. Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 41(6):685-695.

Dijkstra, Th., M. Eysker, G. Shares, F. Conraths, W. Wouda y H. Barkema. 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocyst after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after infection of colostrums spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 31:747-752.

Dijkstra, T., H. W. Barkema, M. Eysker, J. W. Hesselink y W. Wouda. 2002. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet. Parasitol.* 105:99-104.

D'Pool, G., V. Dubraska y C. Díaz. 2005. Manual ganadero de doble propósito. Brucelosis bovina. *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela.*

Dubey, J. P., A. L. Hattel, D. S. Lindsay, M. J. Topper. 1988^a. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193:1259-1263.

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

Dubey, J. P. y D. S. Lindsay, 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67:1–59.

Dubey, J. P., B. C. Barr, J. R. Barta, I. Bjerkas, C. Björkman, B. L. Blagburn, D. D. Bowman, D. Buxton, J. T. Ellis, B. Gottstein, A. Hemphill, D. E. Hill, D. K. Howe, M. C. Jenkins, Y. Kobayashi, B. Koudela, A. E. Marsh, J. G. Mattsson, M. M. McAllister, D. Modry, Y. Omata,

- L. D. Sibley, C. A. Speer, A. J. Trees, A. Uggla, S. J. Upton, D. J. Williams y D. S. Lindsay. 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32:929-946.
- Dubey, J. P. 2003. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89:42-56.
- Dubey, J.P. 2005. Neosporosis in cattle. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* 21:473-483.
- Dubey, J. P., D. Buxton, W. Wouda. 2006. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *J. Comp. Path.* 134:267-289.
- Dubey, J.P. y G. Schares. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140:1-34.
- Dubey, J. P., G. Schares y L. M. Ortega-Mora. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:323-367.
- Dubey, J. P. y G. Schares. 2011. Neosporosis in animals-the last five years. *Vet. Parasitol.* 180:90-108.
- Eicker, S. y J. Fetrow. 2003. New tools for deciding when to replace used dairy cows. *Proc. Kentucky Dairy Conf.*, Cave City, KY. Univ. Kentucky, Lexington. Pp 33-46.
- Eiras, C., I. Arnaiz, G. Álvarez-García, L. Ortega-Mora, M. Sanjuán, E. Yus y F. Diéguez. 2011. *Neospora caninum* seroprevalence in dairy and beef cattle from the northwest region of Spain, Galicia. *Prev. Vet.Med.* 98(2/3):128-132.
- Entrican, G. 2002. Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortions. *J. Comp. Pathol.* 126:79-94.
- Escamilla, H. P., M. J. Martínez, C. M. Medina y S. E. Morales. 2007. Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, México. *Canad. J. of Vet. Res.* 71:314-317.
- Espinosa A. D. y M. S. Morales. 2007. Brote de Toxoplasmosis en una colonia de monos ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio. *Vet. Mex.* 38(3):365-369.
- Estill, C. 2004. *Neospora*-associated abortion and field experience with a commercial vaccine in a dairy herd. 23rd World Buiatrics Congress. July 11-16. Quebec City, Canada.
- Favoreel, H., H. Nauwnck y M. Pensaert. 2000. Immunological hiding of herpesvirus-infected cells. *Arch. Virol.* 145:1269-1290.
- Furtado, A., D. Rosadilla, M. Cattáneo, J. Bermúdez y R. Puentes. 2011. Occurrence of *anti-Neospora caninum* antibodies in small dairy farms in Uruguay. *Ciencia Rural, Santa Maria.* 41(4):673-675.
- Fuchs, N., S. Sonda, B. Gottstein y A. Hemphill. 1998. Differential expression of cell surface and dense granule associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J. Parasitol.* 84:753-758.
- Ghalmi, F., B. China, A. Ghalmi, D. Hammitouche y B. Losson. 2012. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle population. *Res. Vet. Sci.* In press.

- Gándara, B., A. López, M. Rigel y R. E. Martínez. 2001. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 39:235-240.
- García-Vázquez, Z., C. Cruz-Vázquez, T. D. García, E. L. Medina y B. Chavarría. 2002. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, México. *Vet. Parasitol.* 106:115-120.
- García-Vázquez, Z., C. R. Rosario, A. A. Ramos, C. Cruz-Vázquez y S. G. Mapes. 2005. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Vet. Parasitol.* 134:61-65.
- García-Vázquez, Z., C. R. Rosario, E. F. Mejía, V. I. Rodríguez, S. D. Romero, R. M. Fernández y C. Cruz-Vázquez. 2009. Seroprevalence of *Neospora caninum*. *Trop. Anim. Health Prod.* 41(5):749-753.
- Gibney, E. H., A. Kipar, A. Rosbottom, C. S. Guy, R. F. Smith, U. Hetzei, A. J. Trees y D. J. L. Williams. 2008. The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and the foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlated with foetal death. *Int. J. Parasitol.* 38:579-588.
- Givens, M. D., K. P. Riddell, P. H. Walz, J. Rhoades, R. Harland, Y. Zhang, P. K. Galic, B. W. Brodersen, A. M. Cochran, K. V. Brock, R. L. Carson y D. A. Stringfellow. 2007. Noncythopathic Bovine Viral Diarrhoea virus can persist in testicular tissue after vaccination of peri-pubertal bulls but prevents subsequent infection. *Vaccine.* 25:867-876.
- Gondim, L. F. P., L. D. Gao y M. M. McAllister. 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J. Parasitol.* 88:1159-1163.
- Gondim, L. F. P., M. M. McAllister, R. G. Anderson-Sprecker, C. Björkman, T. F. Lock, L. D. Firkins, L. D. Gao, W. R. Fisher. 2004. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocyst. *J. Parasitol.* 90:1394-1400.
- González, J. M. y J. Toro. 2007. The neuroglia in the immune response of the nervous central system. *Acta Neurol. Colomb.* 23:25-30.
- Gogorza, M. L., P. E. Morán, J. L. Larghi, M. A. Iglesias y A. Pérez. 2001. Vacunación contra la Diarrea Viral Bovina; fortalezas y limitaciones. Departamento de Virología y Sanidad Animal. FCV UNCPVA 4-15.
- Habibi, G. R., R. Hashemi-Fesharki, A. Sadrebazzaz, S. Bozorgi y N. Bordbar. 2005. Seminested PCR for diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Arch. Razi Ins.* 59:55-64.
- Hartwig, N.R. 2000. Infectious diseases that affect cattle fertility. Beef Cattle Breeding Management Seminar. Iowa State University, E.U.A.
- Häsler, B., G. Regula, K. Stärk, H. Sager, B. Gottstein y M. Reist. 2006. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland. *Prev. Vet. Med.* 77(3-4):230-253.
- Hässig, M. y B. Gottstein. 2002. Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. *Vet. Rec.* 150:538-542.

- He, Q., P. A. Windsor y P. D. Kirkland. 2004. An outbreak of abortion in a dairy herd associated with *Neospora caninum* and bovine pestivirus infection. *Aust. Vet. J.* 82:99-101.
- Hemphill, A. y B. Gottsein. 1996. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitol. Res.* 82:497-504.
- Hemphill, A., N. Fuchs, S. Sonda, A. Hehl. 1999. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Internat. J. Parasitol.* 29:1175-1188.
- Helman, R.G., E. L. Stair, T. W. Lehenbauer, S. Rogers y J. T. Saliki. 1998. Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. *J. Vet. Diag. Invest.* 10:292-295.
- Hernández J., C. Risco y A. Donovan. 2001. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219:632-635.
- Herrera, L. E, M. M. Ramírez, R. E. Palomares, A. L. Hernández y A. E. Díaz. 2004. Control de brucelosis mediante el monitoreo serológico, eliminación y revacunación con RB51 en un hato bovino lechero. INIFAP.
- Heydorn, A. O. y H. Mehlhorn. 2002^a. A re-evaluation of *Neospora* and *Hammondia* spp. *Trends Parasitol.* 18:246.
- Heydorn, A. O. y H. Mehlhorn. 2002^b. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. *Parasitol. Res.* 88:175-184.
- Hietala, S. K. y M. C. Thurmond. 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Internat. J. Parasitol.* 29:1669-1676.
- Hobson, J. C., T. F. Duffield, D. Kelton, K. Lissemore, S. K. Hietala, K. E. Leslie, B. McEwen, G. Kramer y A. S. Peregrine. 2002. *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 221:1160-1164.
- Hope, J. C., M. L. Thom, P. A. McCormick y C. J. Howard. 2004. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. *Vet. Immunol. Immunopath.* 100:187-195.
- Hosseininejad, M., K. Pirali-Kheirabadi y F. HosseiniIranian. 2009. Seroprevalence of *Neospora caninum* Infection in camels (*Camelus dromedarius*) in Isfahan Province, Center of Iran. *J. Parasitol.* 4(4):61-64.
- Houe, H. 2003. Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals.* 31:137-143.
- Howe, D. K., A. C. Crawford, D. Lindsay y L. D. Sibley. 1998. The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immunol.* 66:5322-5328.
- Hughes, M. J. 2006. The prevalence of *Neospora caninum* and coinfection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitol.* 132(1):29-36.
- Hunter C. A. y S. L. Reiner. 2000. Cytokines and T cells in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 12:413-418.
- Ibrahim, H. M., P. Huang, T. A. Salem, R. M. Talaat, M. I. Nasr, X. Xuan y Y. Nishikawa. 2009. Short report: prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in Northern Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 80(2):263-267.

Innes, E. A., S. E. Wright, S. Maley, A. Rae, A. Schock, E. Kirvar, P. Bartley, C. Hamilton, I. M. Carey y D. Buxton. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 31:1523-1534.

Inees, E. A., A. G. Andrianarivo, C. Björkman, D. J. L. Williams y P. A. Conrad. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects of vaccination. *Trends Parasitol.* 18:497-504.

Inees, E. A., S. Wright, P. Bartley, S. Maley, C. Macalodowie, I. Esteban-Redondo y D. Buxton. 2005. The host parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108:29-36.

Jardine, J. E. 1996. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet. Parasitol.* 62:231-240.

Jenkins, M., T. Baszler, C. Björkman, G. Schares, D. Williams. 2002. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int. J. Parasitol.* 32:631-636.

Kaufmann, H., M. Yamage, I. Roditi, D. Dobbelaere, J. P. Dubey, D. J. Holmdahl, A. Trees y B. Gottstein. 1996. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol Cell Probes.* 10(4):289-297.

Keller, N., A. Naguleswaran, A. Cannas, N. Vonlaufen, M. Bienz, C. Björkman, W. Böhne y A. Hemphill. 2002. Identification of a *Neospora caninum* microneme protein (NcM1C1) which interacts with sulfated host cell surface glycosaminoglycans. *Infect. Immun.* 70:3187-3198.

Keller, N., M. Riesen, A. Naguleswaran, N. Vonlaufen, R. Stetler, A. Leepin, J. Wastling y A. Hemphill. 2004. Identification and Characterization of a *Neospora caninum* Microneme-Associated Protein (NcMIC4) That Exhibits Unique Lactose-Binding Properties. *Infect. Immunol.* 72(8):4791-4800.

Klevar, S. 2007. Tissue cyst forming coccidian; *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* as a cause of disease in farm animals. Perinatal Death In Domestic Animals: The 20th Symposium of the Nordic Committee for Veterinary Scientific Cooperation (NKVet).

Koiwai, M., T. Hamaoka, M. Haritani, S. Shimisu, Y. Zeniya, M. Eto, R. Yokohama, T. Tsutsui, K. Kimura y I. Yamare. 2006. Nationwide seroprevalence of *N. caninum* among dairy cattle in Japan. *Vet. Parasitol.* 135(2):175-179.

Konnai, S., C. N. Mingala, M. Sato, N. S. Abes, F. A. Venturina, C. A. Gutierrez, T. Sano, Y. Omata, L. C. Cruz, M. Onuma y K. Ohashi. 2008. A survey of abortifacient infectious agents in livestock in Luzon, the Philippines, with emphasis on the situation in a cattle herd with abortion problems. *Acta Trop.* 105(3):269-73.

Lasri, S, F. De Meerschman, C. Rettigner, C. Focant y B. Losson. 2004. Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Vet. Parasitol.* 123: 25-32.

León, R. y L. Villamil. 2002. Seroprevalencia de la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Municipio de San Gil, Santander. Tesis de grado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia.

- Lértora, W.J. 2003. Diarrea viral bovina: actualización. Cátedra de Patología General y Sistemática, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE. *Rev. Vet.* 14(1):42-51.
- Lértora, W. J., A. Burna, M. S Catuogno. 2004. Diagnóstico histopatológico de aborto bovino por *Neospora caninum*. *Rev Vet.* 15, 2:82-85.
- Lértora, W.J., B. Mohr, M. Mosqueda y M. Sánchez Negrette. 2010. Detección de *Neospora caninum* en fetos bovinos abortados espontáneamente en el nordeste argentino. *In. Vet.* 12(2):173-182.
- Lindsay, D. S., C. A. Speer, M. A. Toivio-Kinnucan, J. P. Dubey y B. L. Blagburn. 1993. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Vet. Res.* 54:103-106.
- Lindsay, D. S., N. S. Rippey, R. A. Cole, L. C. Parsons, J. P. Dubey y R. R. Tidwell. 1994. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachizoites in cultured cells. *Am. J. Vet. Res.* 55:976-981.
- Lindsay, D. S., J. P. Dubey y B. L. Blagburn. 1996. Finding the cause of parasite induced abortion in cattle. *Vet. Med.* 91(1):64-71.
- Lindsay, D.S., D. M. Ritter y D. Brake. 2001. Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 87:909-911.
- Lista-Alves, D., R. Palomares-Naveda, F. García, C. Obando, D. Arrieta y A. E. Oet. 2006. Serological evidence of *N. caninum* in dual-purpose cattle herd in Venezuela. *Vet. Parasitol.* 136(3-4):347-349.
- López-Gatius, F., M. López-Béjar, K. Murugavel, M. Pabón, D. Ferrer y S. Almería. 2004. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *J. Vet. Med.* 51:348–352.
- López-Gatius F., P. Santolaria, J. L. Yanis, J. M. Garbayo y S. Almeria. 2005. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. *J. Vet. Med.* 52:88-92.
- Lozada, E. F. 2004. Determinación de la presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en hatos lecheros de la Sierra centro-norte del Ecuador, por prueba inmunoenzimática. Tesis de doctor en medicina veterinaria y zootecnia. Universidad Central de Ecuador.
- Macaldowie, C., S. W. Maley, S. Wright, P. Bartley, I. Esteban-Redondo, D. Buxton y E. A. Innes. 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J. Comp. Path.* 129:186-195.
- Made-Damriyasa, I., G. Schares y C. Bauer. 2010. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in *Bos javanicus* (Bali cattle) from Indonesia. *Trop. Anim. Health Prod.* 42:95-98.
- Magaña-Urbina, A., J. L. S. Rivera y J. C. Segura-Correa. 2005. Infectious Bovine Rhinotracheitis in dairy herds in the Cotzio-Tejaro region of Michoacán, Mexico, *Tec. Pec. Mex.* 43:27-37.
- Maley, S. W., D. Buxton, A. G. Rae, S. E. Wright, A. Schock, P. M. Bartley, I. Esteban-Redondo, J. Sales, E. A. Innes. 2003. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle:inoculation at mid-gestation. *J. Comp. Path.* 129:186-195.

- Maley, S. W., D. Buxton, C. N. Macalodowie, I. E. Anderson S. E. Wright, P. M. Bartley, I. Esteban-Redondo, C. M. Hamilton, A. K. Storset y E. A. Innes. 2006. Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J. Comp. Path.* 135:130-141.
- Marsh, A. E., B. C. Barr, J. Madigan, J. Lakritz, R. Nordhausen y P. A. Conrad. 1996. Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209:1907-1913.
- Martins, J., O. C. H. Kwok y J. P. Dubey. 2011. Seroprevalence of *N. caninum* in free range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas. *Vet. Parasitol.* 182(2-4):349-351.
- Mazus, M. L., R. Haynes, V. Shkap, L. Fish, R. Wollkomirsky, B. Leibovich, T. Molad, I. Savitsky y J. Golenser. 2011. *Neospora caninum* in vivo and in vitro treatment with artemisone. *Vet. Parasitol.* In press
- McAllister, M. M., S. F. Parmley, L. M. Weiss, V. J. Welch y A. M. McGuire. 1996. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum*- bradyzoite antigen. *J. Parasitol.* 82:354-355.
- McAllister, M. M., J. P. Dubey, D. S. Lindsay, W. R. Jolley, R. A. Wills y A. M. McGuire. 1998. Dogs are definitive host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28:1473-1478.
- McAllister D. y S. Latham. 2002. *Neospora* 2001. *Trends in Parasitol.* 18:4-5.
- McCann, C. M., A. J. Vyse, R. L. Salmon, D. Thomas, D. J. Williams, J. W. McGarry, R. Pebody y A. J. Trees. 2008. Lack of serology evidence of *N. caninum* in humans, England. *Emerg. Infect. Dis.* 14(6):978-980.
- McGarry, J. W., C. M. Stockton, D. J. Williams y A. J. Trees. 2003. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J. Parasitol.* 89:628-630.
- Meador, V. P. y B. L. Deyoe. 1989. Intracellular localization of *Brucella abortus* in bovine placenta. *Vet. Pathol.* 26(6):513-515.
- Medina, E. L., C. Cruz-Vázquez, T. Quezada, S. E. Morales y V. Z. García. 2006. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, México. *Vet. Parasitol.* 136:187-191.
- Medina, E. L. 2008. Transmisión vertical/horizontal de *Neospora caninum* en un hato infectado naturalmente. Tesis para obtener el grado de doctorado en ciencias pecuarias. Universidad de Colima. Colima, Col.
- Meerburg, B. G., S. De Craeye, A. Kilsta y K. Dierick. 2012. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in brain tissue of feral rodents and insectivores caught on farms in the Netherlands. *Vet. Parasitol.* 184(2-4):317-324.
- Mehlhorn, H. y A. O. Heydorn. 2000. *Neospora caninum*: is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. *Parasitol. Res.* 86:169-178.
- Melo, C. B., R. C. Leite y Z. I. P. Lobato. 2004. Infection by *Neospora caninum* associated with Bovine Herpesvirus 1 and Bovine Diarrhea Virus in cattle from Minas Gerais state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 119:97-105.

- Mineo, T. W., S. Alenius, K. Näslund, H. J. Montassier y C. Björkman. 2006. Distribution of antibodies against *Neospora caninum*, BVDV and BHV-1 among cows in Brazilian dairy herds with reproductive disorders. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 15(4):188-192.
- Moen, A. R., W. Wouda, M. F. Mul, E. A. M. Graat y T. Van Werven. 1998. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology*. 49:1301-1309.
- Moles, L. P., D. Gavaldón, J. Torres, M. A. Cisneros, S. J. Aguirre y N. Rojas. 2002. Seroprevalencia simultánea de leptospirosis y tres enfermedades de importancia reproductiva en bovinos del Altiplano Central de la República Mexicana. *Rev. Salud Anim.* 24(2):106-110.
- Moore, D. P., M. R. Leunda, P.I. Zamorano, A. C. Odeon, S. A. Romera, A. Cano, G. de Yaniz, M. C. Venturini, C. M. Campero. 2005. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet. Parasitol.* 130: 29-39.
- Moore, D. P., J. C. Regidor, E. Morell, M. A. Poso D. B. Cano, M. R. Leunda, L. Linschinky, A. C. Odeón, E. Odriozola, L. M. Ortega-Mora y C. M. Campero. 2008. The role of *N. caninum* and *T. gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. *Vet. Parasitol.* 156(3-4):163-167.
- Morales, S.E., C. E. Puente, M. Santa Cruz y T. F. Trigo. 1997. Diagnóstico histopatológico de fetos abortados en la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo. *Memorias del XXI Congreso Nacional de Buiatría*. Colima, Colima, México. Pp. 23-25.
- Morales, E., J. F. Trigo, F. Ibarra, E. Puente y M. Santacruz. 2001^a. Neosporosis in Mexican dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in foetus. *J. Comp. Path.* 125:58-63.
- Morales, E., F. J. Trigo, F. Ibarra, E. Puente y M. Santacruz. 2001^b. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *J. Vet. Diagn. Investig.* 13:413-415.
- Morales, C. y M. Slever. 2002. Detección de terneros con infección congénita con el virus de la diarrea viral bovina en dos hatos lecheros de la provincia de Arequipa. Tesis (Médico Veterinario)-- Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina Veterinaria. EAP. Lima, Perú.
- Morán, P., M. Di Santo y L. Gogorza. 2006. Transmisión del virus de la Diarrea Viral Bovina. Factores de riesgo en el ingreso y diseminación en los rodeos. *Rev. Vet.* 17(1):50-56.
- Moreno, E. 2002. Brucellosis in Central América. *Vet. Microbiol.* 90:31-38.
- Moreno, B., E. Collantes-Fernández, A. Villa, A. Navarro, J. Regidor-Cerrillo y L.M. Ortega-Mora. 2012. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.* In press. doi:10.1016/j.vetpar.2011.12.034.
- Moskwa, B., K. Pastusiak, J. Bien y W. Cabaj. 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol. Res.* 100(3):633-636.
- Müller, J. J. y A. A. Hemphill. 2011. Identification of a host cell target for the thiazolide class of broad-spectrum anti-parasitic drugs. *Exp. Parasitol.* 128(2):145-150.

- Muñoz-Zanzil, C., S. Hietala, M. Thurmond y W. Johnson. 2003. Quantification, risk factors, and health impact of natural congenital infection with bovine viral diarrhoea virus in dairy calves. *Am. J. Vet. Res.* 64:568.
- Muskens, J., T. Dijkstra y M. Roumen. 2010. Abortion on dairy farms: study results and recommendation. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*. 135(8):338-340.
- Nasir, A., S. R. Lanyon, G. Schares, M. L. Anderson y M. P. Reichel. 2011. Sero-prevalence of *N. caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. *Vet. Parasitol.* In press.
- Nishikawa, Y., M. Mishima, H. Nagasawa, I. Igarashi, K. Fujisaki, H. Otsuka, T. Mikami. 2001. Interferon-gamma-induced apoptosis in host cells infected with *Neospora caninum*. *Parasitol.* 123:25-31.
- Niskanen, R. y A. Lindberg. 2003. Transmission of Bovine Viral Diarrhoea virus by unhygienic vaccination procedures, ambient air, and from contaminated pens. *Vet. J.* 165: 125–130.
- Njaa, B, E. Clark, E. Jansen, J. Ellis y D. Haines. 2000. Diagnosis of Persistent Bovine Viral Diarrhoea Virus Infection of Immunohistochemical Staining of Formalin - Fixed Skin Biopsy Specimens. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 393-399.
- Obando, C. C., M. M. Bracamonte, A. A. Montoya y V. V. Cadenas. 2010. *Neospora caninum* in a dairy cattle herd and its association to abortion. *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia*. 20(3):235-239.
- Obendorf, D. L., N. Murray, G. Veldhuis, B. L. Munday y J. Dubey. 1995. Abortion caused by neosporosis in cattle. *Aust. J. Vet.* 72(3):117-118.
- Odeón, A.C, E. J. Späth, M. R. Paloma, I. J. Leunda, S. E. Fernández-Sainz, G. G. Kaiser, B. M. Draghi y A. C. Cetràs. 2001. Seroprevalencia de la Diarrea Viral Bovina, Herpesvirus Bovino y Virus Sincicial Respiratorio en Argentina. *Rev. Med. Vet.* 82(4):216-220.
- OIE. 2008. Toxoplasmosis. Cap. 2.9.10. 17^o. edición. Ed. Office International des Epizooties.
- OIE. 2010. Infectious Bovine Rhinotracheitis/Infectious Pustular Vulvovaginitis. Cap. 2.4.13. 19^o. edición. Ed. Office International des Epizooties.
- Okeoma, C. M., K. M. Stowell, N. B. Williamson y W. E. Pomroy. 2005. *Neospora caninum* quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted fetuses using real time PCR. *Vet. Parasitol.* 110:48-55.
- Oliveira, V., G. Álvarez-García, L. M. Ortega-Mora, L. F. Borges y A. Silva. 2010. Abortions in bovines and *Neospora caninum* transmission in an embryo transfer center. *Vet. Parasitol.* 173(3/4):206-210.
- Olsen, I., P. Boysen, S. Kulberg, J. C. Hope, G. Jungersen y A. K. Stroset. 2005. Bovine NK cells can produce gamma interferon in response to the secreted mycobacterial proteins ESAT-6 and MPP14 but not in response to MPB70. *Infection and Immunity*. 73:5628-5635.
- Ortega, Y. R., M. P. Torres y K. D. Mena. 2007. Presence of *Neospora caninum* specific antibodies in three dairy farms in Georgia and two in Texas. *Vet. Parasitol.* 144(3-4):353-355.

Ortega-Mora, L. M., I. Ferre, I. del Pozo, A. Caetano-da-Silva, E. Collantes-Fernández, J. Regidor-Cerrillo, C. Ugarte-Garagalza y G. Aduriz. 2003. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Vet. Parasitol.* 117:301-308.

Osawa, T., J. Wastling, L. Acosta, C. Ortellado, J. Ibarra y E. A. Innes. 2002. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Vet. Parasitol.* 110(1-2):17-23.

Otranto, D., A. Liazari, G. Testini, D. Traverse, A. F. Regalbono, M. Balden y G. Capelli. 2002. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet. Parasitol.* 118(1-2):7-18.

Oviedo, S. T., G. Bustamante, J. Mejía. 2008. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico sobre neosporosis en fetos bovinos procedentes de matadero. *Rev. MVZ Córdoba* vol. 13 No. 2:1342-1348.

Paredes, E. y M. Moroni. 2005. Principales causas de abortos diagnosticadas en el período 2003-2005 en fetos bovinos examinados en el Instituto de Patología Animal, Universidad Austral de Chile. *XII Congreso Latinoamericano de Buiatría*, Valdivia, Chile, Pp 148-149.

Paula, V. 2004. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. *Vet. Res. Com.* 28(7):581-585.

Pereira-Bueno J., A. Quintanilla-Gozalo, V. Pérez-Pérez, A. Espi-Felgueroso, G. Álvarez-García, E. Collantes-Fernández, L. Ortega-Mora. 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 111: 143-152.

Pérez, E., O. González, G. Dolz, J. A. Morales, B. Barr y P. A. Conrad. 1998. First report of bovine neosporosis in dairy cattle in Costa Rica. *Vet. Rec.* 142:520-521.

Peter, A. T. 2000. Abortions in dairy cows: New insights and economic impact. *Adv. Dairy Technol.* 12:233-244.

Peters, M., E. Lutkefels, A. R. Heckerroth y G. Schares. 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* 31:1144-1148.

Pfeiffer, D., N. B. Williamson, M. P. Reichel, J. J. Wichtel y W.R. Teague. 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Prev. Vet. Med.* 54:11-24.

QH. Queensland Health. Annual Report, 2011.

Quinn, H. E., J. T. Ellis y N. C. Smith. 2002. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends in parasitol.* 18:391-394.

Razmi, G. R., G. R. Mohammad, T. Garresi, N. Farzaneh, A. H. Fallah y M. Maleki. 2006. Seroepidemiology of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Mashhad area, Iran. *Vet. Parasitol.* 135(2):187-189.

Razmi, G. R.; M. Maleki, N. Farzaneh; M. Talebkhan Garoussi; A. H. Fallah. 2007. First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. *Parasitol. Res.* 100:755-757.

Reichel, M.P. 2000. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. *Aust. Vet. J.* 78:258-261.

Reiterová, K., S. Spilovska, D. Antolova y T. Dubinsky. 2009. *Neospora caninum*, potential cause of abortions in dairy cows: the current serological follow-up in Slovakia. *Vet Parasitol.* 150(1):1-6.

Richey, E. 1994. IBR in beef cattle (infectious bovine rhinotracheitis /red nose) vm95. University of Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences.

Rivera G., H., Z. A. Benito, C. O. Ramos y S. A. Manchego. 2004. Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de la estación experimental de trópico del centro de investigaciones (IVITA). *Rev. Int. Vet. Perú* 15(2):120-126.

Roberts, C. W., W. Walker y W. Alexander. 2001. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:476-788.

Romero, J. J., V. S. Breda, B. Vargas, G. Dolz y K. Frankena. 2005. Effect of neosporosis on productive and reproductive of dairy. *Theriogenology.* 64:1928-1939.

Rodríguez, V. Y. y S. W. Ramírez. 2005. Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. Universidad de Granma. Facultad de Medicina Veterinaria. Centro de Estudios de Prevención y Mitigación de Desastres. Departamento de Sanidad Animal.

Romero, S. F., G. J. Espinosa, R. V. Cuevas, L. G. Moctezuma y B. J. Jolalpa. 2009. Demandas tecnológicas y de política para mejorar la competitividad de la cadena agroalimentaria de leche en el Estado de Hidalgo. *Rev. Mex. Agroneg.* 13(24):774-787.

Romero-Salas, D., Z. García Vázquez, F. Montiel-Palacios, T. Montiel-Peña, M. Aguilar-Domínguez, L. Medina-Esparza y C. Cruz-Vázquez. 2010. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle in Veracruz, Mexico. *J. An. Vet. Adv.* Vol. 9, 10:1445- 1451.

Ronchi, J.I., E. S. Estela, M. R. Leundai y A. C. Odeón. 2001. Infección experimental con el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) genotipo 2 en terneros con anticuerpos neutralizantes al VDVB genotipo 1. *Med. Vet.* XXXIII, 2:185-192.

Rosbottom, A., E. H. Gibney, C. S. Guy, A. Kipar, R. F. Smith, P. Kaiser, A. J. Trees y D. J. L. Williams. 2008. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infect. Immun.* 76:2352-2361.

SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales. Diario Oficial de la Federación.

Salinas, J., V. V. Riojas, G. J. Mora, R. J. Zárate, V. G. Hernández, A. G. Dávalos, A. L. Galán y R. R. Ávalos. 2005. Frequency of *Neospora caninum* antibodies in cattle from northeastern Mexico. *Vet. Mex.* 36(3):303-310.

Sangari, F. J, J. M. Garcia-Lob y J. Agüero. 2000. The *Brucella abortus* vaccine strain B19 carries a deletion in the erythritol catabolic FEMS. *Microbiol.* 146:487-495.

Sauret, J. y N. Vilissova. 2002. Human Brucellosis. *J. Am. Board Fam. Pract.* 15:401-406.

- Schatzberg, S.J., N. J. Haley, S. C. Barr, A. deLahunta, N. Olby, K. Munana y N. J. Sharp. 2003. Use of a multiplex polymerase chain reaction assay in the antemortem diagnosis of toxoplasmosis and neosporosis in the central nervous system of cats and dogs. *Am. J. Vet. Res.* 64:1507-1513.
- Schuster, S, M. Müller, G. Schares, E. Grossmann, T. Neuss, H. Puchta, P. Kreuzer, T. Ewringmann, J. Ehrlein, K. Bogner, W. Schmahl. 2011. Involvement of *Neospora caninum* in bovine abortion in Northern Bavaria. *Konstanz: Terra-Verlag* 28-34
- Simsek, S. A. E. Utuk, E. Koroglu, N. Dumanli y A. Risvanli. 2008. Seroprevalence of *Neospora caninum* in repeat breeder dairy cows in Turkey. *Archiv. Fur Tierzucht.* 51(2):143-148.
- Solis-Calderón, J. J., S. V. Segura-Correa, J. C. Segura Correa y I. A. Alvarado. 2003. Seroprevalence of and risk factors for Infection Bovine Rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Prev. Med. Vet.* 57:199-208.
- Solis-Caledrón, S. S., V. M. Segura-Correa y J. C. Segura-Correa. 2005. Bovine Viral Diarrhoea in beef cattle herds of Yucatán, México: seroprevalence and risk factors. *Prev. Vet. Med.* 72(3-4):253-262.
- Son, J., B. Park, S. Seo, H. Son, S. Cho y S. Ryu. 2011. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle in Gongju and Yeongi and transmission pattern to newborn calves. *J. Vet. Clin.* 28(1):46-51.
- Sonda, S., N. Fuchs, B. Gottstein y A. Hemphill. 2000. Molecular characterization of a novel microneme antigen in *Neospora caninum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 108:39-51.
- Speer, C. A., Dubey, J. P., McAllister, M. M. y Blixt, J. A. 1999. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 29:1509-1519.
- Suteu, O., A. Titilincu, D. Modry, A. Mihalca V. Mircean, C. Vasile. 2010. First identification of *Neospora caninum* by PCR in aborted bovine fetuses in Romania. *Parasitol. Res.* 106:3, 719-722.
- Thellin, O. y E. Heinen. 2003. Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Toxicol.* 185:179-184.
- Thilsted, J. P. y J. P. Dubey. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1:205-209.
- Thurmond, M.C. y S. K. Hietala. 1996. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 57:1559-1562.
- Thurmond, M.C., S. K. Hietala y P. C. Blanchard. 1997. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum* – induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9:44-49.
- Thurmond, M.C., S. K. Hietala y P. C. Blanchard. 1999. Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:90-94.
- Thrusfield, M. 2007. Veterinary Epidemiology. Ed. Acribia. 3ª. Edición. España.

Tizard, J., 2002 Inmunología veterinaria. Sexta edición. Mc Graw Hill Interamericana, S.A. México.

Tolga, T. M., Y. Yacup, E. Nural y G. A. Burak. 2006. The seroprevalence of Bovine Herpesvirus type 1 (BHV-1) and Bovine Leukemia Virus (BLV) in selected dairy cattle herds in Aydin Province, Turkey. *Turk. J. Vet. Anim. Sci*; 30:353-357.

Tranas, J., R. A. Heinzen, L. M. Weiss y M. M. McAllister. 1999. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6:765-767.

Trees, A. J. y D. J. Williams. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends parasitol.* 21(12):558-561.

Uggla, A., S. Stenlund, O. J. Holmdahl, E. B. Jakubek, P. Thebo, H. Kindahl y C. Björkman. 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol.* 28:1467-1472.

USDA. United State Department of Agriculture. Brucellosis eradication program. USDA/APHIS, Diciembre del 2010.

VanGuilder, D., E. Vrana y M. Freeman. 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Review BioTechniques* 44:619-626.

Vázquez, M. E., M. S. Rojo y G. G. Álvarez. 2008. Aborto epidémico y endémico asociado a la infección por *Neospora caninum* en el ganado bovino. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2(2):181-186.

Venturini, L., C. Di Lorenzo, C. Veturini y J. Romero. 1995. Anticuerpos anti-*Neospora* sp. en vacas que abortaron. *Vet. Argentina*. 12:167-170.

Venturini, M. C., L. Venturini, D. Bacigalupe, M. Machuca, I. Echaide, W. Basso, J. M. Unzaga, C. Di Lorenzo, A. Guglielmone, M. C. Jenkins y J. P. Dubey. 1999. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 29:1705-1708.

Viet, A., C. Fourichon, H. Seegers, C. Jacob y C. Guihenneuc-Jouyauc. 2004. A model of the spread of the bovine viral diarrhoea virus within a dairy herd. *Prev. Vet. Med.* 63:211-236.

Waldner, C. L. 2005. Serological status for *Neospora caninum*, Bovine Viral Diarrhea virus, and Infectious Bovine Rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. *Anim. Reprod. Sci.* 90:219-242.

Weersink, A., J. A. Van Leeuwen, J. Chi y G. P. Keefe. 2002. Direct production losses and treatment costs due to four dairy cattle diseases. *Adv. Dairy Technol.* 14:55-75.

Wen, T., Y. Zhao, D. Zhu y M. Jenkins. 2011. Immunization of female BALB/c mice with *Neospora* cyclophilin and/or NcSRS2 elicits specific antibody response and prevents against challenge infection by *Neospora caninum*. *Vaccine*. 29(13):2392-2399.

Weston, J. F., N. B. Williamson y W. E. Pomroy. 2005. Associations between pregnancy outcome and serological response to *Neospora caninum* among a group of dairy heifers. *N. Z. Vet. J.* 53:142-148.

Weston, J. I., C. Hever y N. B. Williamson. 2012. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachizoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 103(2-3):136-144.

Wiengcharoen J., R. C. Thompson, C. Nakthong, P. Rattanakorn y Y. Sukthana. 2011. Transplacental transmission in cattle: is *Toxoplasma gondii* less potent than *Neospora caninum*? *Parasitol. Res.* 108(5):1235-1241.

Wilke G., I. Grummer y B. Moennig. 2003. Bovine Viral Diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals* 31:113-118.

Williams, D. J. L., C. S. Guy, J. M. McGurry, F. Guy, L. Tasker, R. F. Smith, K. MacEarchern, P. J. Cripps, D. F. Kelly, A. J. Trees, A. J. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitol.* 121:347-358.

Williams, D. J. L., C. S. Guy, R. F. Smith, F. Guy, J. W. McGarry, J. S. McKay y A. J. Trees. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 33:1059-1065.

Wouda, W. 2000. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. *Vet. Quart.* 22: 71-74.

Wu J, S. Dreger, E. Chow y E. Bowlby. 2002. Validation of 2 commercial *Neospora caninum* antibody enzyme linked immunosorbent assay. *Can. Vet. Res.* 66:264-271.

www.senasica.gob.mx. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales. Consultado el 14 de marzo del 2012

Xia, H., D. Zhou, K. Jia, X. Zeng, D. Zhang, L. She y X. Zhu. 2011. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle of Southern China. *J. Parasitol.* 97(1):172-173.

Xolalpa, C. V., R. M. Pérez y O. C. García. 2003. Factores asociados a eventos de falla reproductiva de los bovinos hembras del complejo agropecuario e industrial de Tizayuca (CAITSA). *Rev. Salud Anim.* 25:129-137.

Yagoob, G. 2012. Seroepidemiology of *Neospora* sp. in horses in East-Azerbaijan province of Iran. *J. Anim. Vet. Adv.* 11(4):480-482.

Yildiz, K., O. Kul, C. Babur, S. Kılıc, A. N. Gazyagci, B. Celebi y I. S. Gurcan. 2005. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: Special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. *Vet. Parasitol.* 164:306-310.

Zhang, W. C. Deng, Q. Liu, J. Liu, M. Wang, K. G. Tian, X. L. Yu y D. M. Hu. 2007. First identification of *Neospora caninum* infection in aborted bovine fetuses in China. *Vet. Parasitol.* 149:72-76.

9. ANEXOS

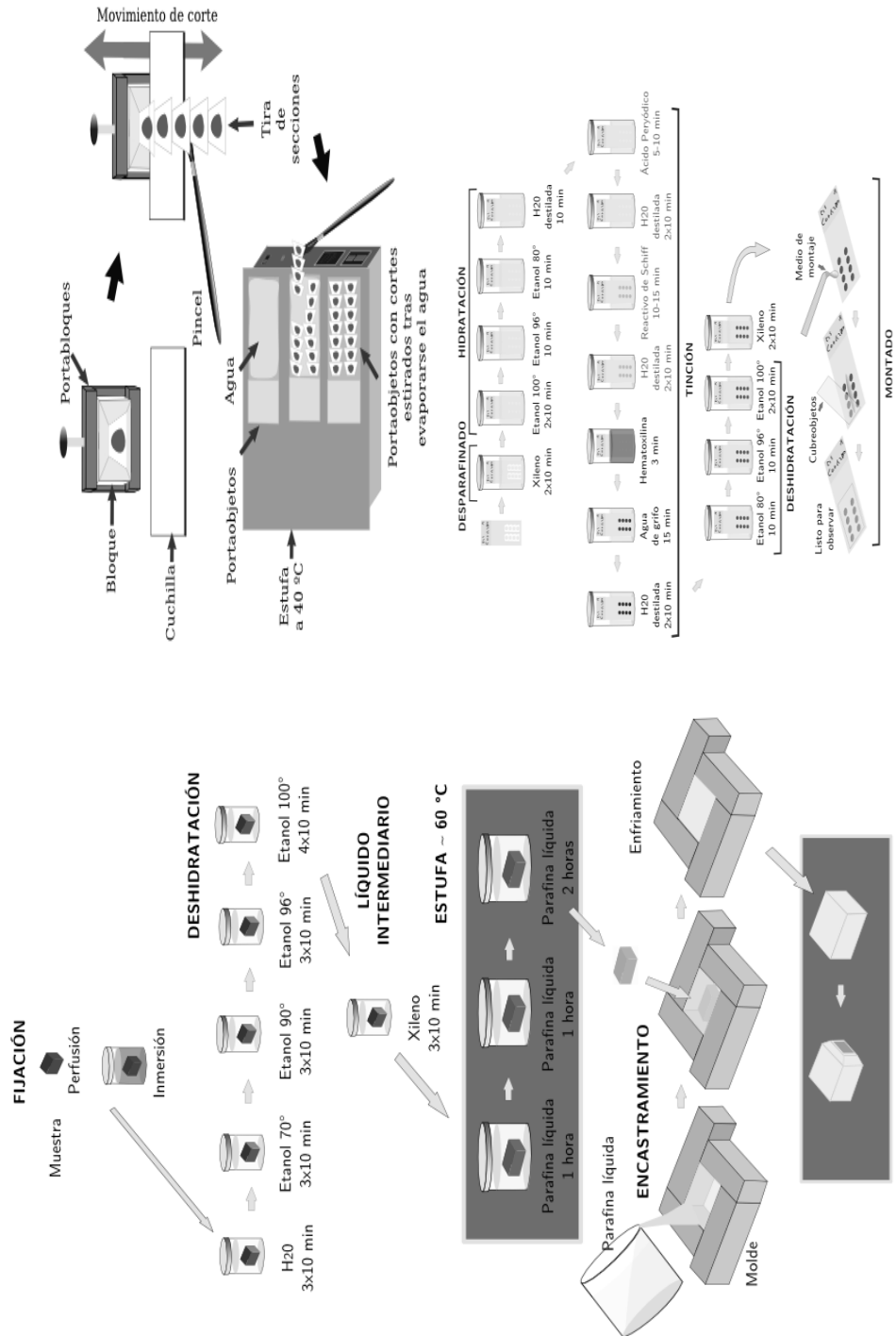
PROCEDIMIENTO PARA LA RECUPERACIÓN DEL ENCÉFALO DE FETOS BOVINOS

Material

- Sierra
- Escoplo
- Martillo
- Escalpelo

Procedimiento

- Extirpar las secciones mayores de tejido blando del cráneo.
- Serrar los huesos dorsales del cráneo transversalmente, formando una línea que pase inmediatamente por detrás de los ojos, realizar dos cortes laterales desde el *foramen magnum* (agujero occipital mayor) hasta los extremos del primer corte, justamente debajo del lugar de implantación de los cuernos.
- Terminar cuidadosamente el corte con un escoplo y martillo, con lo que se puede disminuir la lesión del encéfalo.
- Desprender el fragmento de cráneo cortado, haciendo ligera palanca con el escoplo y despegándolo del resto de la cabeza.
- Extraer el encéfalo, colocando la cabeza sobre el hocico.
- Cortar con un escalpelo los nervios craneales de atrás hacia delante, hasta el tracto olfatorio.



PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA rtPCR DETECCION DE *Neospora caninum*

Material y Reactivos para la extracción de ADN

- Centrífuga Eppendorf para microtubos con velocidad de 8 000 a 15 000 g
- Vortex
- Micropipetas de 0.5 a 1000 µl
- Etanol 100%
- Incubadora a 70°C
- Juego de reactivo QIAamp:
 - ✓ Columnas QIAamp
 - ✓ Tubos de 1.5 ml
 - ✓ Tubos de 2ml
 - ✓ Solución amortiguadora ATL
 - ✓ Solución amortiguadora AL
 - ✓ Solución amortiguadora AW1
 - ✓ Solución amortiguadora AW2
 - ✓ Solución amortiguadora AE

Procedimiento.

Extracción de ADN.

- Pesar 25 mg de cerebro fetal bovino en una balanza de precisión y colocarlo en un microtubo de 1.5 ml
- Añadir 180 µl de la solución amortiguadora ATL y 20 µl de proteinasa k
- Agitar en vortex por 1 min
- Incubar 30 min a 70°C
- Depositar 200 µl de la solución amortiguadora AL y agitar en vortex por 15 seg
- Incubar 10 min a 70°C
- Añadir 200 µl de etanol 100%, agitar en vortex por 15 seg y centrifugar
- Tomar una columna del juego de reactivo QIAamp y agregar el contenido del microtubo a la columna
- Centrifugar por 1 min a 10 000 g
- Colocar 500 µl de la solución amortiguadora AW1
- Centrifugar por 1 min a 10 000 g
- Colocar 500 µl de la solución amortiguadora AW2
- Centrifugar por 1 min a 10 000 g
- Colocar la columna en un tubo de colección nuevo y centrifugar por 3 min a 10 000 g para secar la columna
- Transferir la columna a un nuevo microtubo de 1.5 ml
- Añadir 200 µl de la solución amortiguadora AE
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min y centrifugar por 1 min a 6 000 g
- Guardar la muestra en hielo

Material y Reactivos para la amplificación de ADN

- Termociclador ABI PRISM 7000/7300/7500
- Juego de reactivo TaqVet para la detección de *Neospora caninum*:
 - ✓ 1 grupo de nucleótidos específicos para la detección de *Neospora caninum*
 - ✓ 1 grupo de nucleótidos específicos para la detección del control positivo interno (IPC)
 - ✓ Mix NEOP reconstituido
 - ✓ Control positivo externo (EPC)
 - ✓ Agua libre de ADNasa y ARNasa para utilizarse como control negativo (NCS)

Amplificación de ADN.

- Adicionar 20 µL del reactivo Mix NEOP a todos los tubos de reacción
- Agregar 5 µL del reactivo EPC a los controles positivos
- Colocar 5 µl de agua libre de ADNasa y ARNasa como NCS
- Añadir 5 µl de las muestras de ADN extraído
- Cubrir la placa y colocarla en el termociclador a un ciclo a 50°C durante 2 minutos para predesnaturalización; un ciclo a 95°C de 10 minutos en el alineamiento y finalmente 45 ciclos para la polimerización a una temperatura de 60°C durante 1 minuto
- Interpretar los resultados se realiza de acuerdo con la siguiente tabla:

Interpretación	<<Detector>> Neospora	<<Detector>> IPC
Neospora Positivo	Ct < 45	Ct < 45 ou Ct > 45
Neospora Negativo	Ct > 45	Ct < 45
Muestras no validadas	Ct > 45	Ct > 45

Fuente: LSI, Laboratoire Service International.

PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA (ELISA) DIAGNÓSTICO DE *Neospora caninum* Y DVB

Material y Reactivos.

- Microplacas con antígeno fijado
- Conjugado preparado para uso
- Solución concentrada PBS-Tween 20 (10X)
- Diluyente de muestras
- Solución cromógena –Sustrato-
- Solución de paro H_2SO_4 preparado para uso
- Controles positivos y negativos.
- Incubador a $37^{\circ}C$.
- Lector ELISA
- Micropipetas graduables de 4 a 200 μl y micropipeta múltiple de 20 a 200 μl
- Puntas para micropipeta
- Matraz de 500 ml
- Matraz de 1000 ml
- Agua destilada
- Lavador manual o automático de pocillos

Procedimiento.

- Las soluciones se mantendrán en refrigeración, a $4^{\circ}C$ y protegidas de la luz.
- Los sueros sanguíneos se almacenan en congelación, hasta su uso.
- Equilibrar las soluciones y sueros a temperatura ambiente antes de comenzar el procedimiento.
- Añada 90 μl de la solución diluyente de muestras a cada uno de los pozos que serán utilizados para el diagnóstico de las muestras y controles.
- Añadir 10 μl del control positivo y 10 μl del control negativo por duplicado, en los pozos A1 A2 y B1 B2 respectivamente.
- Coloque 10 μl de cada una de las muestras, a partir del pozo C1.
- Agite la placa, séllela e incube a $37^{\circ}C$ por una hora.
- Enjuague la placa 4 veces con la solución buffer-tween, vacíe la placa y seque.
- Añada 100 μl del conjugado a cada uno de los pozos, agite la placa, séllela e incube a $37^{\circ}C$ por una hora.
- Enjuague la placa 4 veces con la solución buffer-tween, vacíe la placa y seque.
- Añada 100 μl del sustrato a cada uno de los pozos, agite la placa, séllela e incube a temperatura ambiente por 10 min.
- Mida la densidad óptica (D.O.) de los controles y de las muestras a 450nm en el fotómetro de microplacas.
- Calcular el porcentaje de inhibición

Calcular la D. O. media del control positivo	D. O. m CP
Calcular la D. O. media del control negativo	D. O. m CN
Porcentaje de inhibición de la muestra	$\frac{(D. O. m CN - D. O. de la muestra) \times 100}{D. O. m CN}$

% de inhibición < 50	negativo
50 < ó = % de inhibición < 80	bajo positivo
% de inhibición > 80	alto positivo

Fuente: CIVTEST, Laboratorios Hipra, S. A.

PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA (ELISA) DIAGNÓSTICO DE RIB

Material y Reactivos.

- Microplacas con antígeno fijado
- Conjugado preparado para uso
- Solución concentrada PBS-Tween 20 (10X)
- Diluyente de muestras
- Solución cromógena –Sustrato-
- Solución de paro H_2SO_4 preparado para uso
- Controles positivos y negativos.
- Incubador a 37°C .
- Lector ELISA
- Micropipetas graduables de 4 a 200 μl y micropipeta múltiple de 20 a 200 μl
- Puntas para micropipeta
- Matraz de 500 ml
- Matraz de 1000 ml
- Agua destilada
- Lavador manual o automático de pocillos

Procedimiento.

- Las soluciones se mantendrán en refrigeración, a 4°C y protegidas de la luz.
- Los sueros sanguíneos se almacenan en congelación, hasta su uso.
- Equilibrar las soluciones y sueros a temperatura ambiente antes de comenzar el procedimiento.
- Diluir las muestras 1:100 con la solución diluyente de muestras.
- Coloque 50 μl de los controles positivos y negativos por duplicado y 50 μl de cada una de las muestras diluidas 1:100.
- Agite la placa, séllela e incube a 37°C por una hora.
- Enjuague la placa 3 veces con la solución buffer-tween, vacíe la placa y seque.
- Añada 50 μl del conjugado a cada uno de los pozos, agite la placa, séllela e incube a 37°C por una hora.
- Enjuague la placa 3 veces con la solución buffer-tween, vacíe la placa y seque.
- Añada 50 μl del sustrato a cada uno de los pozos, agite la placa, séllela e incube a temperatura ambiente por 10 min.
- Mida la densidad óptica (D.O.) de los controles y de las muestras a 450nm en el fotómetro de microplacas.
- Calcular el índice relativo (IRPC)

Calcular la D. O. media del control positivo	D. O. m CP
Calcular la D. O. media del control negativo	D. O. m CN
IRPC	$\left\{ \frac{\text{D. O. de la muestra} - \text{D. O. m CN}}{\text{D. O. m CP} - \text{D. O. m CN}} \right\} 100$

IRPC menor o igual a 20	negativo
IRPC mayor a 20	positivo

Fuente: CIVTEST, Laboratorios Hipra, S. A.

PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA DE AGLUTINACIÓN EN TARJETA

Material y Reactivos.

- Antígeno de *B. abortus* cepa de 1119-3 al 8 % de concentración celular en bovinos y del 3 % en caprinos, teñido con rosa de bengala en ácido láctico. El antígeno debe tener un pH de 3.65 (+/-0.05) y conservado a 4°C.
- Pipetas de 0.1 ml.
- Placas de vidrio transparente de 48 x 33 cm, con cuadrícula de 3 x 3 cm. Cada cuadrado se utiliza para un sólo suero.
- Sueros control positivo y negativo.
- Palillos de madera y/o agitador múltiple de 5 ramas.
- Aglutinoscopio.

Procedimiento.

- Colocar en la placa de vidrio 0.03 ml de la muestra problema.
- Agregar 0.03 ml de antígeno.
- Mezclar con agitador o palillo.
- Realizar movimientos de rotación de la placa, durante cuatro minutos.
- Observar la placa en un aglutinoscopio y proceder a la lectura.

Rosa uniforme sin aglutinación	-
Aglutinación apenas perceptible	+
Aglutinación fina	++
Aglutinación marcada	+++

Sensibilidad	94.5 %
Especificidad	52.2 %

Fuente: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA. 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

PROCEDIMIENTO PARA LA REALIZACIÓN DE LA PRUEBA DE RIVANOL

Cuando se obtienen sueros positivos a la prueba de tarjeta, la prueba de rivanol puede diferenciar entre animales vacunados o animales infectados naturalmente por *B. abortus*.

Material y Reactivos.

- Antígeno de *B. abortus* cepa 1119-3, teñido con una mezcla de verde brillante y cristal violeta, con pH 5.8 a 6.2 y 4% de concentración celular.
- Solución de rivanol al 1% (lactato de 2-etoxi-6-diamino acridina).
- Pipetas de 0.2 ml graduadas en 0.01 a 0.001 µl.
- Placas de vidrio de 48 x 33 cm, con cuadrados de 3 x 3 cm.
- Palillos de madera o agitador múltiple de 5 ramas.
- Aglutinoscopio.
- Centrífuga.
- Tubos de 13 x 100.

Procedimiento.

- La solución de rivanol se mantendrá en refrigeración, a 4°C y protegido de la luz.
- Los sueros sanguíneos se almacenan en congelación, hasta su uso.
- Identificar tantos tubos de ensayo esterilizados como muestras a probar.
- Mezclar solución de rivanol al 1% y suero problema a volúmenes iguales de 0.4 ml en los tubos de ensayo correspondientes. Dejar a temperatura ambiente entre 10 min. y una hora.
- Centrifugar a 3000 rpm / 10 minutos.
- Colocar en una placa de vidrio, separadamente, el sobrenadante en diluciones 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200.
- Agregar 0.03 ml de antígeno en cada cuadro.
- Mezclar con un agitador iniciando por la dilución más alta.
- Agitar el contenido de la placa, realizando movimientos de rotación cuatro veces, esperar seis minutos. Repetir la operación y observar al aglutinoscopio.

Aglutinación completa	Grumos separados, líquido claro	+
Aglutinación incompleta	Grumos visibles, líquido no claro	+
No hay aglutinación		-

Sensibilidad	90.6 %
Especificidad	67.4 %

Fuente: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SAGARPA. 1997. Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

