

01685

1
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

**DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO Y EPIDEMIOLOGIA DE
LA NEOSPOROSIS BOVINA EN EL ALTIPLANO
MEXICANO**

T E S I S

**para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS: PATOLOGIA
presentada por:**

MVZ ELIZABETH MORALES SALINAS

Dirigida por:

**MVZ, MSc., PhD, Francisco J. Trigo Tavera
MVZ, DMV, Froylán Ibarra Velarde
MVZ, MSc, PhD, Francisco Suárez Güemes
MVZ, Dr. Jorge Tórtora Pérez
MVZ, PhD, Alfredo Sahagún Ruiz
MVZ, PhD, Roberto Cervantes Olivares
MVZ, Dr. Gilberto Chávez Gris**



México, D. F.

270619

1999

**TESIS CON
FALLA DE OR. LN**

I



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



Elizabeth Morales Salinas

DEDICATORIAS

A mis padres: Eliseo Morales Hernández y Guadalupe Salinas de Morales por haberme dado la vida y enseñarme un camino correcto

A mi esposo Nestor Ledesma Martínez y a mis hijos Karen Elizabeth Soto Morales y Nestor Ledesma Morales, por la gran alegría que le han dado a mi vida y por ser una fuerte razón para vivir

A mis hermanos: Fernando, Ma. Guadalupe, Ma. De Lourdes, Ma. Eugenia, Laura y Ma. Gabriela Morales Salinas por su ejemplo y éxito obtenido en sus vidas

A los Dres. Alfonso López Mayagoitia y Francisco Trigo Tavera por ser amigos y pilares en todo mi desarrollo profesional

A todos mis amigos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y del Instituto Nacional de Virología de la GGBR

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer muy sinceramente a mis asesores, **Dr. Francisco J. Trigo Tavera** y **Dr. Froylán Ibarra Velarde** así como a los integrantes del Comité Tutorial de Doctorado, **Dr. Francisco Suárez Guemes**, **Dr. Jorge Tórtora Pérez**, **Dr. Alfredo Sahagun Ruiz**, **Dr. Roberto Cervantes Olivares** y **Dr. Gilberto Chávez Gris**, por su gran profesionalismo, asesoría y tiempo dedicado al desarrollo de éste trabajo, así como a los **Dres. Eduardo Puente Casillas** de Pfizer S.A. de C.V. y **Mario Santa Cruz** del C.A.I.T., por la gran ayuda desinteresada en la obtención de las muestras que requirió este trabajo y por su amistad. Mi agradecimiento a mi esposo **Nestor Ledesma Martínez** y a mis hijos **Karen Elizabeth Soto Morales** y **Nestor Ledesma Morales** por la paciencia y apoyo brindado en todos los aspectos para la realización de este trabajo. También agradezco a la técnica en histopatología **Guadalupe Juárez Jiménez** por su invaluable participación en el desarrollo de las técnicas histológica e inmunohistoquímica, así como a los técnicos en histopatología **Luis Morales Arreola**, **Eduardo López Miranda** y la **Biol. Larisa Chávez Soriano** por su generosa ayuda en el laboratorio. Un agradecimiento muy especial a los **Dres. Juan Montaña Hirose**, **Raymundo Iturbe Ramírez**, **Emeterio Saldívar Zuñiga** y **Adriana Mata Villegas** del Depto. de Microbiología e Inmunología por la confianza que me brindaron para trabajar en dicho departamento, así como al **Sr. Juan Merino B.** del Depto. de Producción Aves por sus consejos en el manejo de cultivos celulares. Agradezco al **Dr. Humberto Ramírez Mendoza** del Depto. de Producción Porcina y a la Química **Natividad Martín Orozco** del Depto. de Inmunología del Centro Médico Nacional Siglo XXI por su colaboración en la donación de cultivos celulares. También deseo agradecer a la **Dra. Irma Eugenia Candanosa** del Depto. de Patología Clínica por su gran apoyo en la obtención de reactivos para el desarrollo de la ELISA y por haberme permitido el uso de equipo para realizar dicha prueba, así como a la **Dra. Ma. Elena Rubio** del Depto. de Producción Animal Aves por su asesoría en la técnica de ELISA. De la misma manera, agradezco de todo corazón a el **Dr. Alfonso López Mayagoitia** de la U.P.E.I. en Canadá por la donación de reactivos para el desarrollo de la inmunohistoquímica, por el envío de información reciente acerca de la Neosporosis y por su valiosa amistad. Extiendo mi agradecimiento al **Dr. J.P. Dubey** del Instituto de las Ciencias en Ganadería y Aves de corral, del Depto. de Agricultura de Beltsville de los E.U.A., por sus consejos, observaciones y literatura enviada para el desarrollo de éste trabajo, así como a la **Dra. Deborah Haines** de la Universidad de Saskatchewan, Canadá por su donación de tejidos positivos a *Neospora*

caninum, los que fueron utilizados como testigos positivos en la inmunohistoquímica. Deseo agradecer a todo el **Depto. de Patología**: a la **Dra. Nuria De Buen de A.** jefe del Depto., por creer en mí y por su apoyo, así como al **Sr. Jaime Eugenio Córdova López**, por su colaboración en el material fotográfico, a la **Srita. Emma Serrano Sánchez**, por su participación en el trabajo de computación requerido, a la **Dra. Ma. de la Cruz Domínguez Punaro**. por su apoyo en la redacción de textos en inglés, a **Luz María Rosales** por su colaboración en la microscopía electrónica, al **Sr. Aureliano García Torres**, por su gran ayuda en la sala de necropsias y la **Sra. Carmen Ramos** por su ayuda y amistad. Extiendo mi agradecimiento a la **Dra. Elizabeth Rodríguez Galindo** y a todos los ayudantes y estudiantes de la especialización en Anatomopatología Veterinaria, por su gran amistad. También mi agradecimiento a los **Dres. Edgar Olguín Larios (Torreón)**, **Victor M. Chacón López (Torreón)**, **Julio César Limón Varela (Querétaro)**, **Sergio Castañeda J. (Aguascalientes)**, **Armando Hernández García (México)** y **José Heredia (México)** de Pfizer. S.A. de C.V., así como al **Dr. Ramón Delgado G.** de CAIPEL, Torreón, por su ayuda en la remisión de tejidos fetales a México. Finalmente deseo dar mi agradecimiento al **CONACyT.** por haberme brindado la oportunidad de cursar estudios de doctorado al otorgarme una beca, a el **proyecto PADEP 016311** de la **UNAM** y al **proyecto No. 506194** del **Depto. de Microbiología e inmunología**, por la valiosa ayuda financiera para llevar a cabo esta investigación

RESUMEN CURRICULAR

La MVZ Elizabeth Morales Salinas, realizó estudios de Licenciatura en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM en el período entre 1980 y 1984, obteniendo el título de MVZ el 20 de mayo de 1985. En el período entre 1988 y 1989, realizó estudios de Especialización en Planificación en Salud Animal obteniendo el respectivo diploma el 1º de septiembre de 1989 así como el reconocimiento como estudiante destacado siendo acreedora a la Medalla de Plata "Gabino Barreda". Se ha desempeñado como Profesor de Asignatura en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM impartiendo las asignaturas de Patología Sistémica y General entre 1985 y 1991 y de 1991 a la fecha ha fungido como Profesor de Carrera de Tiempo Completo impartiendo las asignaturas antes mencionadas, e impartiendo clases de Especialización en Anatomopatología Veterinaria. En 1992 obtuvo el premio "Manuel H. Valtierra" por su destacada labor docente. Entre 1989 y 1992 trabajó en el sector público en la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la SSA (Instituto Nacional de Higiene e Instituto Nacional de Virología) realizando labores de control de calidad de biológicos y patología. En 1993, trabajó en la División de Educación Continua de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. como Coordinadora de Diplomados. Actualmente realiza labores de diagnóstico, investigación y difusión en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M.

RESUMEN

Morales Salinas Elizabeth: Diagnóstico inmunológico y epidemiología de la Neosporosis bovina en el Altiplano Mexicano. (Bajo la dirección de: MVZ, MSc., PhD, Francisco J. Trigo Tavera; MVZ, DMV, Froylán Ibarra Velarde; MVZ. MSc, PhD, Francisco Suárez Güemes; MVZ, Dr. Jorge Tórtora Pérez; MVZ, PhD, Alfredo Sahagun Ruiz; MVZ, PhD, Roberto Cervantes Olivares y MVZ, Dr. Gilberto Chávez Gris).

Debido a la alta prevalencia de la Neosporosis bovina que se ha presentado en otros países ocasionándoles pérdidas económicas substanciales y a que existe escasa información de la enfermedad en México, se consideró necesario realizar investigaciones epidemiológicas para conocer con mayor profundidad el impacto que tiene esta enfermedad, por lo que el objetivo general del presente trabajo fue conocer la frecuencia aproximada de la enfermedad en México, por medio de la identificación del parásito y lesiones asociadas mediante estudios histopatológico e inmunohistoquímico y a través del aislamiento del agente en cultivos celulares a partir de tejidos fetales, así como a través de una encuesta serológica en vacas lecheras utilizando la técnica de ELISA. Para la histopatología se revisaron secciones de miocardio, encéfalo, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y bazo de 211 fetos, los que fueron procesados por la técnica histológica de rutina. En 73 fetos (35%), se encontraron lesiones características de Neosporosis, y 53 de estos se emplearon para el estudio inmunohistoquímico utilizando un Complejo-Avidina-Biotina-Peroxidasa, el cual se aplicó en el encéfalo, miocardio e hígado, ya que fueron los órganos más afectados. Para el aislamiento del agente se trabajaron 28 encéfalos de fetos y 2 encéfalos de neonatos utilizando cultivos celulares. Para la encuesta serológica se muestrearon 50 hatos lecheros mexicanos con un total de 1003 sueros, 43 hatos presentaban alta incidencia de abortos, los 7 restantes no presentaban problemas reproductivos aparentes, por lo que fueron utilizados como testigo. Para el análisis de éstos resultados, se determinó el número y porcentaje de animales seropositivos y seronegativos tanto de los hatos problema como de los hatos testigo, se calculó el índice de probabilidad (OR) para establecer la interacción entre la respuesta serológica y el aborto. Las lesiones más constantes asociadas a Neosporosis se apreciaron en el miocardio, encéfalo, hígado y músculo esquelético. 58 fetos (80%), presentaron miocarditis no supurativa. 39 fetos (54%), presentaron gliosis y necrosis multifocal, en 6 de éstos se apreciaron quistes parasitarios. 39 fetos (54%), presentaron hepatitis periportal no supurativa y 19 fetos (26%) presentaron miositis no supurativa. En la

inmunohistoquímica, se pudieron identificar antígenos parasitarios en 41 fetos (78%), de los cuales en 19 (46%) se localizaron en 1 órgano, en 15 (37%) en dos órganos y en 7 (17%) en los tres órganos estudiados. En cuanto al aislamiento, de los 30 cerebros trabajados sólo se logró el crecimiento de taquizoitos en un sólo caso a los 23 días posteriores a la inoculación del cultivo celular. Los resultados de la encuesta serológica fueron los siguientes: En los hatos problema, 404 sueros (72%) resultaron positivos y 159 sueros (28%) resultaron negativos, mientras que en los hatos control, 157 sueros (36%) resultaron positivos y 283 sueros (64%) resultaron negativos. El índice de probabilidad fue de 4.5 (3.49, 5.47) con 95% de intervalo de confianza lo cual indicó que la probabilidad de abortar en los hatos problema fue de 4.5 veces más que en los hatos testigo, por lo que se observó que existe una fuerte asociación entre la seropositividad hacia anticuerpos anti-*Neospora caninum* y el aborto. De acuerdo a los resultados de este trabajo se puede concluir en forma general que la Neosporosis bovina se encuentra difundida ampliamente al menos en las principales cuencas lecheras del país, hecho sustentado al encontrar estructuras parasitarias y lesiones características de la enfermedad en los fetos, así como la identificación del parásito a través de la inmunohistoquímica y el aislamiento del agente en cultivo celular a partir de tejido encefálico de un feto, además de encontrar evidencia serológica positiva en un alto porcentaje en hatos con alta incidencia de abortos.

SUMMARY

Morales Salinas Elizabeth: Immunological and epidemiological diagnosis of bovine Neosporosis in Mexico. (Under the supervision of: MVZ, MSc., PhD, Francisco J. Trigo Tavera; MVZ, DMV, Froylán Ibarra Velarde; MVZ, MSc, PhD, Francisco Suárez Güemes; MVZ, Dr. Jorge Tórtora Pérez; MVZ, PhD, Alfredo Sahagun Ruiz; MVZ, PhD, Roberto Cervantes Olivares y MVZ, Dr. Gilberto Chávez Gris).

Bovine Neosporosis is a highly prevalent disease in many countries, where it causes important economic losses. There is not enough information about this disease in México, so it was necessary to conduct epidemiological studies for a better understanding of this disease. The main objective of this research was to estimate the frequency of this disease in México, through identification of the etiologic agent and lesions associated, using histopathological and immunohistochemical tests and also by agent isolation in cell culture from fetal tissues and through ELISA test in dairy cows. Sections of heart, brain, lung, liver, skeletal muscle, kidney and spleen from 211 fetuses were studied by routine histological technique. 73 fetuses (35%), had typical lesions of Neosporosis. The brain, heart and liver from 53 of them were used for immunoperoxidase staining (ABPC). For agent isolation, 28 brains from fetuses and 2 brains from seropositive newborn calves were worked out by cell culture. For the serological survey, 50 dairy herds were studied using sera samples from 1003 cows. 43 herds had a high incidence of abortion and the other 7 which did not have apparent reproductive failure, were used as herd controls. From the analysis of these results, the number and percentage of seropositives and seronegatives animals from both problem and control herds was determined. Odds Ratio (OR) was estimated to establish the interaction between the serological response and abortion. The most important lesions associated to Neosporosis were found in the heart, brain, liver and skeletal muscle. 58 fetuses (80%), had nonsuppurative myocarditis. 39 fetuses (54%), had glial proliferation and multifocal necrosis and 6 of them showed parasite cysts, 39 fetuses (54%), had nonsuppurative periportal hepatitis and 19 fetuses (26%) had nonsuppurative myositis. By the immunohistochemical tests, it was possible to identify parasite antigens from 41 fetuses (78%). From these, 19 (46%) were found in 1 organ, 15 (37%), in 2 organs and 7 (17%), in 3 organs. 30 brains were cultured, isolating tachyzoites from only one of them. Tachyzoites were identified 23 days after cell inoculation. The results of the serological survey were the following: From problem herds, 404 sera (72%) were positive and 159 sera (28%) were negative, while in control herds, 157 sera (36%) were positive and 283 sera (64%) were negative. The OR was 4.5

(3.49, 5.47) with a 95% confidence interval, indicating a 4.5 times higher probability of abortion in problem herds. It was observed there was a strong association between the seropositivity and abortion. According with the results from this research, it is possible to conclude that bovine Neosporosis is widely found at least in the main dairy herds of Mexico. These data are supported by the fact that parasite structures and characteristic lesions of the disease were found, and also by the immunohistochemical identification of the parasite and its isolation from a fetal brain. Also there was a high seropositivity in herds with an elevated incidence of abortion.

INDICE

	PAGINA
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Historia	1
1.2 Estructura y ciclo de vida	4
1.3 Biología molecular	7
1.4 Patogénesis y signos clínicos	7
1.5 Aislamiento y cultivo	8
1.6 Diagnóstico	9
1.6.1 Métodos de diagnóstico en los fetos y neonatos	9
1.6.2 Métodos de diagnóstico en las vacas	12
1.7 Prevención y control	13
1.7.1 Estrategias de control con respecto a la infección congénita	13
1.7.2 Estrategias de control en la transmisión posnatal	13
1.8 Tratamiento	14
1.9 Impacto económico	14
1.10 Neosporosis bovina en México	15
1.11 Justificación	15
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 HIPÓTESIS	16

	PAGINA
4 MATERIAL Y MÉTODOS	17
4.1 Criterio para la selección de fetos	17
4.2 Estudio histopatológico	17
4.3 Estudio inmunohistoquímico	17
4.4 Técnica de inmunoperoxidasa en tejidos fijados con formalina al 10%	18
4.4.1 Metodología	18
4.4.2 Utilización de testigos	20
4.5 Encuesta serológica	21
4.5.1 Metodología	21
4.6 Aislamiento y cultivo del parásito	23
4.7 Protocolo de aislamiento <i>in vitro</i> de <i>Neospora caninum</i>	23
4.8 Análisis de resultados	25
5 RESULTADOS	26
5.1 Histopatología	26
5.2 Inmunohistoquímica	30
5.3 Encuesta serológica	32
5.4 Aislamiento <i>in vitro</i> y características de crecimiento	35
6 DISCUSIÓN	37
7 LITERATURA CITADA	48

LISTA DE CUADROS

CUADRO	PAGINA
1. Causas de aborto identificadas por histopatología en diferentes estados de México.	28
2. Tipo de lesión y severidad en diversos órganos. (número de casos y porcentaje)	29
3. Frecuencias por edad y sexo de 49 fetos con lesiones características de Neosporosis.	29
4. Inmunohistoquímica para <i>Neospora caninum</i> en encéfalo, miocardio e hígado de 53 fetos con lesiones características de Neosporosis.	31
5. Detección de anticuerpos anti- <i>Neospora caninum</i> en 50 hatos del altiplano mexicano.	33
6. Distribución de la seropositividad en hatos problema y hatos testigo (número y porcentaje)	34
7. Correlación de 32 casos por histopatología y serología.	34

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Microfotografía de miocardio en la que se aprecian abundantes células inflamatorias mononucleares en las fibras musculares (Miocarditis no supurativa severa). 400 X. H. E.	57
2. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia agregación de abundantes células gliales (Gliosis). 400 X. H. E.	57
3. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia un foco de necrosis rodeado por abundantes células inflamatorias mononucleares. 400 X. H. E.	58
4. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia agregación de células gliales y linfocitos alrededor de un vaso sanguíneo. 400 X. H. E.	58
5. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia un quiste parasitario correspondiente a <i>Neospora caninum</i> . Nótese la ausencia de reacción inflamatoria. 1000 X. P. A. S.	59
6. Microfotografía de hígado en la que se aprecian abundantes células inflamatorias mononucleares pequeñas con distribución periportal. 400 X. H. E.	59

FIGURA	PAGINA
7. Microfotografía de hígado en la cual se aprecia un foco de necrosis. 400 X. H. E.	60
8. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia un quiste parasitario correspondiente a <i>Neospora caninum</i> . Nótese que se tiñe por completo de color café ocre. 1000 X. I. P.	60
9. Microfotografía de cerebro en la cual se aprecia un grupo de taquizoitos. 1000 X. I. P.	61
10. Microfotografía de miocardio en la que se aprecian taquizoitos dentro de las fibras musculares. 1000 X. I. P.	61
11. Microfotografía de miocardio en la que se aprecia un quiste parasitario dentro de una célula nerviosa. 1000 X. I. P.	62
12. Microfotografía de hígado en la que se aprecia un grupo de taquizoitos. 1000 X. I. P.	62
13. Microfotografía de una célula en cultivo (Vero) en la cual se aprecia la salida de parásitos a través de ella (Flecha). 400 X.	63
14. Microfotografía en la cual se aprecian taquizoitos dentro y fuera de las células de cultivo (Flechas). 1000 X. I. P.	63
15. Microfotografía en la que se aprecian taquizoitos fuera de las células de cultivo (Flechas). 1000 X. I. P.	64
16. Microfotografía en la que se aprecian abundantes taquizoitos. I. F. reacción positiva (Flechas). 400 X.	64

DIAGNOSTICO INMUNOLOGICO Y EPIDEMIOLOGIA DE LA NEOSPOROSIS BOVINA EN EL ALTIPLANO MEXICANO

INTRODUCCIÓN:

Neospora caninum es un protozooario perteneciente al phylum Apicomplexa, estructuralmente similar a *Toxoplasma gondii*, pero diferente a este ultraestructural y antigénicamente (1,2,3,4,5,6). Se ha encontrado afectando en forma natural en perros (4,7,8,9,10), bovinos productores de leche (11,12,13,14,15,16), bovinos productores de carne (17,18,19), ovinos (20,21), caprinos, (22,23), equinos (24,25,26) y venados (27,28). En primates no humanos (29), gatos (30), zorros, coyotes, mapaches (19), ratas (31), ratones (32,33,34,35) y gerbos (36), la infección por el parásito se ha producido experimentalmente ocasionando el cuadro clínico en estos animales. *Neospora caninum* causa enfermedad fatal en perros de todas las edades; sin embargo, se ha descrito con mayor frecuencia en perros jóvenes en los cuales la enfermedad se caracteriza por parálisis severa y progresiva (2,4,7,10). La Neosporosis en el ganado se caracteriza por aborto entre el tercer y noveno mes de gestación ocurriendo con mayor frecuencia entre el quinto y sexto mes de gestación, parálisis neonatal o el nacimiento de becerros portadores asintomáticos, por lo que en algunos países ha determinado pérdidas económicas sustanciales (1,11,37,38).

Historia: Una enfermedad parecida a la Neosporosis fue reconocida en 6 perros Boxer por Bjerkas *et al.* en Noruega en 1984 (7,8,9,39). Cinco de estos perros desarrollaron alteraciones neurológicas de 2 a 6 meses después del nacimiento. En el estudio histopatológico se encontraron estructuras parasitarias parecidas a *Toxoplasma gondii* en cerebro y músculos. sin embargo no se encontraron anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en el suero de los perros. Dubey *et al.* en 1988 (4) encontraron un parásito similar en 10 perros de los Estados Unidos de Norteamérica, distinguiéndolo de *Toxoplasma gondii* y llamándolo *Neospora caninum*. En el mismo año. Dubey *et al.* (32). aislaron a

Neospora caninum de perros con infección natural y lo cultivaron en ratones y en cultivo de células y con ello indujeron Neosporosis en perros experimentalmente. Lindsay y Dubey en 1989 (5), desarrollaron una prueba inmunohistoquímica para identificar antígenos de *Neospora caninum* en tejidos fijados en formalina amortiguada, usando anticuerpos anti *Neospora caninum* provenientes de un conejo inoculado con el parásito, permitiendo el diagnóstico seguro de Neosporosis en los animales. Bjerkas y Dubey en 1991 (40), compararon estructuralmente y antigénicamente los parásitos encontrados en tejidos fijados en formalina de los perros de Noruega y Estados Unidos y llegaron a la conclusión de que la parasitosis originalmente encontrada en perros de Noruega era *Neospora caninum*. Sin embargo, la Neosporosis no es una enfermedad nueva, ya que Dubey *et al.* en 1988 y en 1990 (41,42,43), realizaron un estudio retrospectivo inmunohistoquímico de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina de los casos diagnosticados como infección por *Toxoplasma gondii* en tejidos de perros, e identificaron a *Neospora caninum* en animales que habían muerto en los Estados Unidos en 1957 y 1958. Esto indica que muchos casos que previamente se habían diagnosticado como Toxoplasmosis, eran en realidad infecciones por *Neospora caninum* ya que ambos parásitos son muy semejantes morfológicamente en cortes histológicos y no se sospecharon parásitos diferentes.

En California Estados Unidos, la Neosporosis bovina se ha reconocido recientemente como la principal causa de aborto en esta región. Desde 1985, en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario en California se había observado un patrón de lesiones histológicas nuevo en fetos provenientes de vacas lecheras. Las lesiones fetales consistían en encefalitis no supurativa focal y necrosis miocarditis y miositis no supurativa e inflamación no supurativa en otros órganos. Estas lesiones eran similares a las encontradas por Toxoplasmosis en el ganado ovino. sin embargo, no hubo evidencia serológica de infección por *Toxoplasma gondii* en el ganado que había abortado (11,12,14). En 1990, en el Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de California se realizó un estudio

extenso en un periodo de 2 años de los casos de abortos remitidos. Las lesiones histológicas compatibles con infección por protozoarios en cerebro y corazón se observaron en el 18 % de todos los fetos provenientes de California (12,14). En otro estudio realizado en El Valle de San Joaquín en California, principalmente en ganado lechero, se observó una alta incidencia de infección por protozoarios. En este estudio se examinaron un total de 468 fetos de los cuales 95 (20.3%) tenían lesiones características de infección por protozoarios y en 15 (3.2%) se encontraron estructuras parasitarias en el cerebro (15). La confirmación de Neosporosis bovina en California se logró a través de un estudio retrospectivo con la técnica de inmunoperoxidasa utilizando suero específico anti *Neospora caninum* producido en conejo por Lindsay y Dubey (5), indicando que la enfermedad ha sido endémica desde al menos 1985 (38). Este suero se seleccionó después de la primera asociación de aborto por un protozoario parecido a *Neospora caninum* en ganado lechero en Nuevo México en 1987 (37), y en un neonato Shorthorn proveniente de Maryland, Estados Unidos (44). En 1991 se realizó el primer aislamiento de *Neospora caninum* en Estados Unidos, a partir de fetos abortados y desde entonces se ha mantenido en cultivos de células endoteliales de arteria cardiopulmonar y monocitos de bovino entre otros (45) y se ha podido inducir la enfermedad en el ganado a partir de este aislamiento (46). La infección por *Neospora caninum* se considera como la principal causa de aborto en el ganado lechero identificada en California. En comparación con otras causas de aborto infeccioso, el aborto por protozoarios es 3.5 veces más frecuente que la infección bacteriana más común (*Actinomyces pyogenes*) y 5 veces más frecuente que la infección viral más común (RIB) (11,16) y desde 1985, *Neospora caninum* se ha identificado en más de 600 fetos abortados provenientes de más de 250 hatos (47).

En un estudio reciente realizado por Anderson *et al.* en Estados Unidos en 1995 (47). con el propósito de estimar la tasa mínima de aborto atribuible a infección por *Neospora caninum* en hatos lecheros seleccionados en California, encontraron que de 26 hatos con 19,708 vacas, ocurrieron 266

abortos en un período de 1 año, de los cuales 113 (42.5%) se asociaron a infección por *Neospora caninum* como causa identificada. Catorce de estos hatos tenían antecedentes de abortos atribuibles a Neosporosis y en los 12 hatos restantes no se había identificado al agente como causa de aborto. Doscientos treinta y dos de los 266 fetos provenían de los hatos con antecedentes de Neosporosis y de estos en 101 (43.5%) se identificó a *Neospora caninum* como causa de los abortos. Los 34 fetos restantes provenían de los hatos sin antecedentes de Neosporosis y de estos, en 12 fetos (35.3%) se identificó a *Neospora caninum* como causa de los abortos. Este estudio indica que se ha elevado considerablemente el porcentaje de abortos atribuibles a Neosporosis con respecto a informes de abortos publicados previamente en California.

La Neosporosis bovina se ha reconocido también como la principal causa de aborto en Holanda, diagnosticándose entre el 16 y 21% de los fetos suministrados para diagnóstico (48), así como la principal causa de aborto en Nueva Zelanda (49); además se ha asociado como causa de aborto en varios países del mundo tales como, Gran Bretaña (50,51), Bélgica (52), Australia (53), Japón (54), Sudáfrica (55), Israel (56), Irlanda (57), Suecia (58), Canadá (59,60,61) y Argentina (62).

Estructura y ciclo de vida: El ciclo de vida y como el protozooario induce al aborto en el ganado no se conoce, sin embargo, recientemente se sabe que una vía de transmisión es a través de la placenta y que esta puede ocurrir repetidamente en el mismo animal (63,64,65). En un estudio realizado por Paré, *et al.* (65), determinaron seropositividad en becerros sanos de 2 hatos, 30.6% (85/278) y 53.55% (68/127) respectivamente, previo a la ingestión de calostro, demostrando que la infección congénita, no necesariamente tiene un efecto detrimental en la salud de los becerros o determina el aborto, por lo que se considera que esta es la principal forma de conservación de la enfermedad en los hatos. La transmisión congénita se ha inducido experimentalmente en perros (66), gatos (67), ovinos (68), bovinos (69) y ratones (70). Se piensa que el parásito puede tener un ciclo de vida similar al de

Toxoplasma gondii, transmitiéndose a un huésped susceptible a través de la ingestión de ooquistes presentes en las heces de algún huésped carnívoro definitivo como el perro. Los quistes con múltiples bradizoitos en el sistema nervioso central (SNC) y grupos de taquizoitos en los tejidos, son las únicas fases del ciclo que se han reconocido. En estudios experimentales realizados en gatos, perros, coyotes, mapaches y algunas aves inoculados con taquizoitos por las vías subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa y oral, no se han podido detectar ooquistes de *Neospora caninum* en las heces. (9,19).

En un estudio ultraestructural de los bradizoitos de los quistes de *Neospora caninum* realizado por Jardine en 1996 (71), indica que no existe diferencia morfológica entre *Neospora caninum* de los perros y la *Neospora* encontrada en el ganado.

Los taquizoitos son ovalados o en forma de media luna y miden de 3 a 7 por 1 a 5 μm . dependiendo del estadio se dividen en 2 zooitos por endodiogenia. En animales infectados los taquizoitos se encuentran en macrófagos; polimorfonucleares; células nerviosas tales como células de Schwann, neuronas, células ependimales, células de la retina y astrocitos; fibroblastos; células endoteliales. miocitos; células epiteliales tubulares del riñón; hepatocitos y otras células del cuerpo. La célula infectada puede contener hasta 100 taquizoitos. Los taquizoitos se encuentran dentro del citoplasma de la célula huésped con o sin vacuola parasitófora (VP). Los taquizoitos de *Neospora caninum* tienen organitos semejantes a los de *Toxoplasma gondii*, sin embargo existen algunas diferencias. los taquizoitos de *Neospora caninum* tienen una membrana citoplásmica con 3 capas, 22 microtúbulos. 2 anillos apicales, 1 conoide, un anillo polar de 1 a 3 mitocondrias, menos de 150 micronemas. 8 a 12 “rhoptries” anteriores al núcleo y de 4 a 6 “rhoptries” posteriores al núcleo. que son organitos apicales con forma de pera. que se cree están involucrados en la invasión de la célula del huésped por parte del parásito, un complejo de Golgi, un retículo endoplásmico liso y un rugoso, un núcleo y un nucleolo. Los “rhoptries” contienen un material sólido electrodenso y son 2 a 4 veces más gruesos

que el diámetro de los micronemas (6,8,9,43,72,73). La discrepancia entre los organitos encontrados en los parásitos de los perros en Noruega y los de los Estados Unidos en cuanto a el número de "rhoptries" fue de más de 30 por Bjerkas y Presthus en 1989 (41) y más de 18, por Speer y Dubey en 1989 (74). Esta diferencia se puede atribuir a la dificultad de distinguir "rhoptries" de los gránulos densos. Los microporos no se han visto en taquizoitos de animales, pero sí se han encontrado en taquizoitos obtenidos de cultivos celulares (39,41).

Los quistes con Bradizoitos en los tejidos, son con frecuencia de redondos a ovales, hasta de 107 μm de diámetro y se encuentran sólo en el tejido nervioso (cerebro, médula espinal y retina). La pared del quiste es lisa y mide hasta 4 μm de espesor, dependiendo del tiempo de infección. En muchos quistes tisulares la pared es de 1 a 2 μm de espesor. La pared del quiste contiene estructuras parecidas a túbulos, no hay septos y no existe pared quística secundaria (2,6,8,9,43,72,73).

Los bradizoitos son delgados de 6 a 8 por 1 a 1.8 μm y contienen los mismos organitos que se encuentran en los taquizoitos con excepción de que existen menos "rhoptries" y estos son más PAS-positivos. La pared de los quistes se tiñe en forma variable con PAS. Entre los bradizoitos existen estructuras tubulares y vesiculares y pueden contener microporos (2,6, 8,9,43,72,73).

Con la ayuda del microscopio electrónico de transmisión se pudieron detectar las diferencias ultraestructurales entre los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* y los de *Neospora caninum*. Dentro de las principales diferencias se incluyen la estructura y el número de "rhoptries". Los "rhoptries" son más numerosos en *Neospora caninum* que en *Toxoplasma gondii*, y el contenido de los "rhoptries" es electrodenso en *Neospora caninum* y electrotransparente en *Toxoplasma gondii*. La principal diferencia entre *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en cuanto a los quistes es el espesor de la pared: la pared de los quistes de *Neospora caninum* mide de 1 a 4 μm y la de *Toxoplasma gondii* mide hasta 0.5 μm (1,38,43,74).

Biología molecular: La posición taxonómica de *Neospora caninum* es incierta debido a que el ciclo de vida se desconoce. El análisis de la secuencia de pequeñas subunidades de ribosomas del RNA (ssrRNA) de *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* mostraron cuatro nucleótidos diferentes entre estos dos parásitos, mientras que comparaciones similares entre los aislamientos de *Neospora* de bovinos y canideos, no mostraron diferencias en cuanto a los nucleótidos (75). En comparaciones recientes usando una amplificación polimórfica al azar del DNA (RAPD) PCR, Guo y Johnson en 1995 (76), encontraron un polimorfismo significativo entre los géneros *Neospora*, *Toxoplasma* y *Sarcocystis*, concluyendo que *Neospora caninum* es una especie independiente. La información derivada del DNA del agente, ha sido importante para el diagnóstico al utilizar diferentes genes y técnicas de PCR para el diagnóstico (77).

Patología y signos clínicos: El aborto es el único signo clínico observado en la vaca infectada. Vacas de cualquier edad pueden abortar entre el tercer y noveno mes de gestación, ocurriendo con mayor frecuencia entre el quinto y sexto mes. Los fetos pueden morir en útero, ser reabsorbidos, momificados, autolizados, pueden llegar a término pero nacer con problemas neurológicos debido a encefalomiелitis o nacer clínicamente normales pero infectados crónicamente. No se encuentran lesiones macroscópicas características en fetos, placenta, ni en neonatos y generalmente no existe retención placentaria. O'Toole y Jeffrey en 1987 (19,78), informaron que un becerro de 5 días de nacido presentó incapacidad para ponerse de pie y a la necropsia se encontró despigmentación, especialmente de la sustancia gris del cerebro. La momificación de fetos ha sido un hallazgo clínico patológico importante, sin embargo ha sido difícil determinar la causa de esta momificación ya que los tejidos se encuentran muy autolizados en el estudio histopatológico (9,16). El parásito afecta principalmente al encéfalo y médula espinal, miocardio, músculo esquelético e hígado. Los órganos

afectados con menor frecuencia son el pulmón, el riñón, la piel, nódulos linfáticos, bazo, ojos y glándulas adrenales. Siendo *Neospora* un patógeno intracelular, puede matar rápidamente las células del huésped por multiplicación activa de taquizoitos produciendo necrosis, inflamación no supurativa y reacción granulomatosa en los tejidos afectados. Los quistes con bradizoitos suelen ser escasos y con frecuencia no se rodean de reacción inflamatoria. La reacción granulomatosa alrededor de los quistes degenerados en SNC, sugiere su ruptura y la subsecuente reacción inflamatoria por parte del huésped. El tiempo en el que permanecen los quistes en el SNC no se conoce (1,8,9,13,14,38,63,79). Lo común es que no hayan malformaciones en los fetos, sin embargo ha habido un informe de hidrocefalia asociada a Neosporosis (80).

Aislamiento y cultivo: *Neospora caninum* se puede aislar a partir de tejidos de fetos abortados en cultivos celulares, sin embargo el aislamiento es poco exitoso debido a que los tejidos fetales se autolizan rápidamente y probablemente con esto también mueran los parásitos. El aislamiento del parásito también dependerá del número de microorganismos presentes (19,45). *Neospora caninum* se aisló solamente en 2 de 100 fetos de bovino con Neosporosis histológicamente confirmada (45). Además de en los perros, el parásito sólo se ha podido aislar a partir de fetos abortados en Estados Unidos (19,45), Japón (81) y Suecia (82). *Neospora caninum* se cultivó inicialmente *in vitro* en monocitos de bovino (BM) y en células endoteliales de arteria cardiopulmonar de bovino (PCA) (83). Desde entonces, *Neospora caninum* se ha mantenido en cultivos celulares de riñón de bovino, cerebro de feto de ratón, fibroblastos de piel de humano, células Vero y algunos otros cultivos celulares bien establecidos. La selección del cultivo celular aparentemente no es crítica, sin embargo es importante observar los cultivos celulares hasta por 2 meses, debido a que pueden haber muy pocos parásitos o que estos tarden en adaptarse al cultivo celular (19). Aparentemente es más fácil obtener un cultivo exitoso a partir de tejido nervioso de un feto a término o de un neonato, ya que los quistes con

bradizoitos son más resistentes que los taquizoitos (19) Sólo los taquizoitos se han identificado en cultivos celulares. *Neospora caninum* no produce una infección consistente en ratones y ratas normales inmunocompetentes. La única manera de infectar experimentalmente a estos roedores es administrándoles 2 inyecciones con 2 a 4 mg de acetato de metilprednisolona durante 7 días antes de la inoculación vía subcutánea con 10 o más taquizoitos. La neumonía y la encefalomiелitis son las lesiones predominantes en ratones mientras que las ratas desarrollan hepatitis en forma primaria. El número de quistes con bradizoitos en los tejidos de estos animales es variable e impredecible. Los quistes tisulares en los ratones son mucho más pequeños (10-25 µm) en los casos experimentales que los encontrados en las infecciones naturales (32,83).

Diagnóstico: La confirmación de abortos o problemas neurológicos en becerros, compatibles con Neosporosis, requiere de un diagnóstico integral en donde se utilicen diferentes técnicas ya sea en el feto abortado o en el neonato y en la madre. Las técnicas diagnósticas que se han utilizado en los tejidos fetales y que son más confiables, son la histopatología y la inmunohistoquímica, así como la inmunofluorescencia de los líquidos fetales, mientras que en la madre se han utilizado técnicas serológicas para la detección de anticuerpos como la ELISA e inmunofluorescencia (19).

Métodos de diagnóstico en los fetos y neonatos:

Anatomopatológico.- No existen lesiones macroscópicas características en la placenta. Puede ocurrir autólisis y momificación, y en general no existen hallazgos macroscópicos contundentes. Pueden haber pequeños focos blanquecinos en el miocardio y músculos esqueléticos que corresponden a zonas de necrosis e inflamación. Las lesiones más significativas y características son microscópicas y se encuentran en encéfalo y médula espinal abarcando principalmente la sustancia gris, ocasionando encefalomiелitis no supurativa con infiltración linfocitaria perivascular con necrosis y gliosis

multifocal. No existen informes de una localización específica de lesiones en el cerebro. Además se encuentra miocarditis y miositis no supurativa multifocal y hepatitis periportal no supurativa con focos de necrosis. Ocasionalmente puede haber inflamación y necrosis en otros órganos. En los cortes histológicos es posible observar quistes de redondos a ovales con numerosos bradizoitos únicamente en SNC o grupos de taquizoitos en SNC, así como en otros tejidos principalmente en tejido muscular; sin embargo, estas lesiones y estructuras similares se pueden observar también en casos de infección por *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis sp.* por lo que es recomendable realizar pruebas de inmunohistoquímica para demostrar antígenos específicos de *Neospora caninum*. Cabe señalar que en casos de Toxoplasmosis se pueden encontrar abundantes quistes con bradizoitos en SNC y en otros órganos como el hígado, riñón, pulmón o tejido muscular, mientras que en los casos de Neosporosis los quistes con bradizoitos son escasos y sólo se encuentran en SNC. Por otro lado *Sarcocystis sp.* es de mayor tamaño y tiene un especial tropismo por células endoteliales del SNC y tejido muscular (1.13.17.44.55.60.63,78.79.84.85.86.87).

Se pueden realizar también estudios ultraestructurales de tejidos de los fetos con la ayuda de la microscopía electrónica, para la identificación de organitos característicos del microorganismo, sin embargo, este estudio requiere fijadores especiales, materiales y equipo sofisticado, los cuales se encuentran en pocos laboratorios, además de que el diagnóstico se dificulta debido a los escasos quistes parasitarios encontrados en el SNC. Por otro lado, como método diagnóstico resulta ser definitivo y es más aplicable en casos de confirmación de aislamientos en cultivos celulares (1,2,6).

Inmunológico.- Estudios previos han demostrado que no existe antigenicidad cruzada o es mínima por IFA entre *Neospora caninum* y otros protozoarios como *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis sp.* por lo que las pruebas serológicas suelen ser de gran utilidad para el diagnóstico de Neosporosis utilizando anticuerpos anti- *Neospora caninum* (88).

La inmunohistoquímica utilizando técnicas de inmunoperoxidasa con anticuerpos primarios anti *Neospora caninum*, es un método diagnóstico muy confiable y específico, realizado en los tejidos fetales incluidos en parafina para identificar antígenos específicos del parásito, permitiendo diferenciarlo de otros protozoarios con estructura y lesiones semejante (1,5,38,89), lo que se refleja en el estudio realizado por Wouda *et al.* (90), quienes encontraron en 80 fetos con Neosporosis, taquizoitos en el 85% de los cerebros, 14 % de los corazones y en el 26% de los hígados, además de identificar quistes parasitarios en el 21% de los cerebros.

Recientemente Cole *et al.* (3,91), han desarrollado la técnica de anticuerpos monoclonales para la detección de *Neospora caninum* en fetos abortados. Un anticuerpo murino monoclonal (MAB) 6G7 dirigido a los taquizoitos de *Neospora caninum* es capaz de reconocer 8 antígenos mayores y algunos antígenos menores, lo cual se puede observar a través del análisis de Western blot. La migración relativa de los 8 antígenos mayores fluctúa de 31 a 97.4 kd. Adicionalmente el MAB 6G7 reconoce antígenos de los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* con migración de 107 kd. La técnica utilizada en los taquizoitos de *Neospora caninum* cultivados en fibroblastos de piel de humano indica que el MAB 6G7 se une a los micronemas, gránulos densos, "rhoptries" de la porción basal y túbulos intravacuolares dentro de la vacuola parasitófora. El MAB 6G7 también se une a los micronemas y la porción basal de los "rhoptries" de los taquizoitos de *Toxoplasma gondii*.

También se ha utilizado la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFA), la cual ha demostrado ser efectiva para detectar altos niveles de anticuerpos anti-*Neospora* en el suero de becerros infectados en forma congénita, a través de la placenta, tomando la muestra antes de la ingestión de calostro. Además esta técnica puede ser útil para establecer el diagnóstico en fetos abortados desde los 5 meses de gestación en adelante, encontrando elevados niveles de anticuerpos en los fluidos fetales (92,93).

Métodos de diagnóstico en las vacas:

La detección de anticuerpos específicos anti-*Neospora caninum* en el suero de las vacas, ha sido de gran ayuda para realizar estudios seroepidemiológicos y para ello se han utilizado la inmunofluorescencia indirecta (IFA) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

El diagnóstico de Neosporosis bovina a través de ELISA ha revelado una sensibilidad del 88% y una especificidad del 97%. La técnica de ELISA se puede utilizar para determinar la seroprevalencia del hato a través del muestreo de sueros al azar de un mínimo de 30 vacas adultas, con más de 30 días posparto (en lactación). La prevalencia se puede calcular basándose en el total del número de vacas en producción. El Sistema de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario en California (CVDLS) sugiere que se realice el muestreo 2 veces, tanto de las vacas que no han abortado como de las vacas que si han abortado y que la colección del suero provenga de un grupo de vacas que estén en el mismo periodo de gestación o posparto y que tengan una edad similar. Recientemente se ha reconocido que la técnica de ELISA resulta ser consistente, objetiva, rápida y precisa además de sensible y específica, ya que por el momento no se pueden detectar anticuerpos vacunales y a que existe limitada reactividad cruzada con respecto a otros protozoarios (19,94,95,96)

Aunque la técnica de IFA ha sido útil para el diagnóstico serológico en casos de infección congénita y para determinar el estado inmunológico del hato, es difícil su interpretación en casos individuales, ya que puede dar resultados falsos negativos debido a que 2 a 5 meses después del aborto, los niveles de anticuerpos que eran elevados pueden disminuir a niveles muy parecidos a los de animales no infectados (19,94,95).

Prevención y Control: Hasta la fecha no se han podido establecer métodos de prevención y control satisfactorios de la Neosporosis bovina, debido a que se tiene insuficiente información de la biología del parásito sobre todo de su ciclo y forma de transmisión, aún sabiéndose que la transmisión congénita puede ser la más común si no es que la única en algunos hatos, sin embargo Thurmond y Hietala (96), sugieren las siguientes estrategias:

Estrategias de control con respecto a la infección congénita:

Para reducir el riesgo de transmisión congénita, lo recomendable sería la eliminación paulatina de las vacas infectadas que pudieran parir becerros infectados y con ello garantizar la persistencia de la enfermedad por largo tiempo. Esto es posible si la prevalencia de la enfermedad en el hato es baja. La infección congénita también se puede reducir reemplazando poco a poco el hato solamente con vacas seronegativas. Esta medida puede resultar menos costosa que la eliminación de animales (97).

Estrategias de control en la transmisión posnatal:

Para poder minimizar la transmisión posnatal vía posible huésped carnívoro definitivo, como en los casos de Toxoplasmosis, lo recomendable sería romper con su ciclo de transmisión, evitando el contacto directo y la ingestión de la placenta, tejidos y fluidos fetales por parte del posible huésped definitivo, así como evitando la posible ingestión de heces por parte del ganado en el agua o en el alimento. Los huéspedes definitivos podrían ser aves, perros, gatos, ratas, ratones o coyotes. Las medidas de control deben incluir la eliminación de fetos abortados, becerros muertos y placentas, así como minimizar el número de gatos, perros o cualquier fauna nociva en la explotación. Para minimizar la posible transmisión a partir de la ingestión de tejidos o fluidos provenientes de abortos o partos de vacas infectadas, por vacas no infectadas, lo recomendable es tener parideros individuales, o separar a los animales positivos de los negativos durante los partos o quizás incluso durante la preñez (38,96).

Recientemente se está trabajando experimentalmente con diferentes formulaciones de una vacuna inactivada para la prevención de la Neosporosis bovina, se ha encontrado que los títulos de anticuerpos contra *Neospora* varían de < 40 a 80 antes de la vacunación, y de 320 a 5120 dos semanas después de la vacunación, sin embargo todavía no se tienen resultados definitivos (98).

Tratamiento: Los fármacos que se han utilizado para inhibir el desarrollo de *Toxoplasma gondii* en cultivos celulares también son efectivos para inhibir el desarrollo de *Neospora caninum* cuando se usan en concentraciones similares. Específicamente, lasalocid sódico a 0.05 mg/ml, monensina sódica a 0.05 mg/ml, piritrexina a 0.01 mg/ml, pirimetamina a 0.05 mg/ml y trimetropin a 5 mg/ml son efectivos para prevenir el desarrollo de taquizoitos intracelulares de *Neospora caninum* en cultivo de tejidos de monocitos de bovino, mientras que el amprolium hidroclorado a 10 mg/ml, sulfadiazina a 200 mg/ml y sulfametoxalina a 200 mg/ml no han sido efectivos. Experimentalmente se ha visto que la sulfadiazina en el agua de bebida previene la Neosporosis clínica en ratones experimentalmente infectados, no obstante no es efectivo cuando ya existen manifestaciones clínicas (8,9,43,83,99,100,101,102).

Impacto económico: Las pérdidas económicas además de las directas por los abortos y muertes neonatales, se deben también al desecho prematuro de animales infectados y a la reducción en la producción de leche de las vacas abortadas e infectadas. En los Estados Unidos, las pérdidas asociadas a los abortos y a las muertes neonatales se estiman en 200 millones de dólares anuales aproximadamente (103). En un estudio realizado por Thurmond y Hietala (104), encontraron que la producción semanal de leche de 118 vacas seropositivas fue significativamente menor (2.5 libras/vaca/día) que el de las 254 vacas seronegativas estudiadas.

Neosporosis bovina en México: En México existe escasa información sobre esta enfermedad entre los médicos veterinarios y productores pecuarios; además no se han realizado estudios epidemiológicos en vacas ni en los fetos de bovinos abortados sospechosos de infección por *Neospora* debido a que el parásito no se conocía y no se dirigía el diagnóstico de aborto por *Neospora* a los diferentes laboratorios de diagnóstico veterinario en la República Mexicana. Existe un primer informe de la enfermedad en el Noreste de México detectada por las lesiones encontradas en 6 fetos provenientes de un hato de 800 vacas, cuyos abortos se habían incrementado desde 1981. el diagnóstico fue realizado en los Estados Unidos (105). Por otra parte en un estudio patológico de aborto en bovinos Holstein realizado por Delgado *et al.* (106) en la Comarca Lagunera, Torreón, Coahuila, encontraron de manera inesperada en un total de 30 fetos, que 22 (73.3%) de estos presentaban miocarditis no supurativa, como la lesión más evidente y asociada en 6 ocasiones a encefalitis no supurativa y se cree que se trataba de infección por *Neospora sp.*; sin embargo no se practicó la prueba de inmunoperoxidasa. Morales, *et al.* (107), describieron el primer caso confirmado de aborto bovino asociado a Neosporosis realizado en México, diagnosticado a través de histopatología e inmunohistoquímica.

Justificación: Debido a la escasa información de la Neosporosis bovina que se tiene en México, es necesario realizar investigaciones epidemiológicas para conocer con mayor profundidad el impacto que tiene esta enfermedad y para ello se deberán establecer técnicas diagnósticas rápidas y conclusivas como son la inmunoperoxidasa en los fetos y la ELISA en las vacas y así poder establecer medidas de prevención y control confiables y finalmente una posible terapéutica.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL: Generar información epidemiológica de la Neosporosis bovina en el Altiplano mexicano, mediante la identificación de *Neospora caninum* y sus lesiones características, así como por el aislamiento de éste agente a partir de tejidos fetales y mediante encuesta serológica en vacas, utilizando técnicas de diagnóstico validadas internacionalmente.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1.- Identificar a *Neospora caninum* y las lesiones asociadas al parásito en los tejidos de los fetos abortados mediante estudio histopatológico e inmunohistoquímico.
- 2.- Realizar una encuesta serológica en vacas utilizando la técnica indirecta de ELISA.
- 3.- Establecer una técnica de aislamiento del parásito a partir de tejidos de fetos abortados en cultivos celulares en México.

HIPOTESIS:

Neospora caninum se encuentra difundida en el Altiplano mexicano representando una causa importante de aborto en bovinos.

MATERIAL Y METODOS:

Criterio para la selección de fetos

Se muestrearon 211 fetos de bovinos productores de leche procedentes del Altiplano mexicano, abortados entre el tercer y octavo mes de gestación, en las mejores condiciones, evitando en lo posible el estado de autólisis. Se inspeccionó la placenta y fluidos fetales, y se practicó la necropsia. En lo posible se obtuvieron las historias clínicas e historia reproductiva de las vacas en cuestión.

Estudio Histopatológico

De las necropsias practicadas se tomaron muestras de cerebro y cerebelo, miocardio, músculo esquelético, hígado, pulmón, riñón y bazo, las cuales fueron fijadas en formalina amortiguada al 10% a pH 7.4 y fueron procesadas por la técnica histológica de rutina para su inclusión en parafina, y tinción con hematoxilina y eosina (H.E.). Además se realizaron tinciones especiales complementarias de PAS y Gram cuando se consideró necesario (108). Se estudiaron detenidamente al microscopio de luz las muestras de los órganos anteriormente mencionados buscando lesiones características y estructuras compatibles con el parásito.

Estudio inmunohistoquímico

Para el estudio inmunohistoquímico, se emplearon las secciones de cerebro, miocardio e hígado de 53 de 73 fetos (73%) que presentaron lesiones características de Neosporosis, por ser los órganos más frecuentemente afectados, tomando en cuenta también a los tejidos más completos y mejor conservados. A estos tejidos se les practicó la técnica de inmunohistoquímica usando un Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa, siguiendo el método recomendado por el fabricante¹ como se describe a

¹ VMRD, Inc. P.O. Box 502 NW 115 State St. Pullman, WA 99163

continuación con el fin de identificar antígenos propios del parásito y poder diferenciarlo de parásitos que producen lesiones similares y son semejantes morfológicamente.

Técnica de inmunoperoxidasa utilizada en tejidos fijados con formalina al 10%

En esta técnica se utilizaron 3 reactivos, un anticuerpo primario, un anticuerpo secundario que estaba químicamente ligado a la vitamina biotina, y un complejo de la glicoproteína avidina ligada a la biotina y peroxidasa.

En este caso se utilizó un anticuerpo primario anti-*Neospora caninum* de origen caprino² un anticuerpo secundario biotinilado y un complejo avidina-biotina peroxidasa (ABPC)³ para la identificación de taquizoitos en el miocardio e hígado y quistes de *Neospora caninum* o taquizoitos en el cerebro o cerebelo incluidos en parafina. Se realizaron cortes de 3 µm de grosor de estos tejidos y fueron adheridos en laminillas preparadas con la solución adhesiva Poli-L-Lysina⁴ para evitar el desprendimiento de los tejidos.

Metodología

Los tejidos se desparafinaron a una temperatura de 60° C durante 10 minutos y con xilol durante 10 minutos. Para completar la desparafinación, las laminillas se lavaron con alcohol absoluto 3 veces.

Para inhibir la actividad de peroxidasa endógena, las muestras se trataron con 3% de peróxido de hidrógeno en metanol durante 10 minutos.

Para la rehidratación de los tejidos, las laminillas se sumergieron en alcoholes a diferentes concentraciones (95%, 80%, 70%) y finalmente en agua desionizada.

Se procedió a realizar digestión enzimática de los tejidos utilizando una solución de proteasa¹ diluida con solución de Tris al 0.1% con pH de 7.6, durante 10 minutos a temperatura de 37° C. Esta

² VMRD, Inc. P.O. Box 502 NW 115 State St. Pullman, WA 99163

³ Dako Corporation, Carpintería, CA 93013 USA

⁴ Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508, St. Louis, Missouri 63178-0016

digestión se utilizó con el fin de exponer antígenos parasitarios intracelulares y se recomienda en tejidos que han permanecido en formalina por un tiempo prolongado. Después de la digestión, los tejidos se lavaron con agua desionizada durante 5 minutos y con una solución con pH de 7.6 (TTBS-HS/Tx).

Con el propósito de bloquear uniones de anticuerpos inespecíficas, se utilizó un suero normal de conejo al 5%² diluido con solución de Tris pH 7.6. Este suero debe ser de la misma especie en la cual el anticuerpo puente o secundario fue hecho. Se procedió a aplicar el anticuerpo primario. en este caso anti- *Neospora caninum* producido en cabra diluido con solución de Tris pH 7.6 a una concentración de 1: 3000, durante 30 minutos a temperatura de 37° C, después de la incubación se realizó un lavado de las muestras con solución de TTBS-HS/Tx.

Posteriormente se aplicó el anticuerpo puente o secundario biotilado producido en conejo diluido a una concentración de 1: 600, y se incubó durante 20 minutos a temperatura de 37° C. Después de la incubación, se realizó un lavado con solución de TTBS-HS/Tx.

Se procedió a aplicar el Complejo Avidia-Biotina-Peroxidasa diluido con solución de Tris pH 7.6. durante 20 minutos a temperatura de 37° C. La glicoproteína avidina tiene la habilidad de ligarse a cuatro moléculas de biotina, en forma no inmunogénica. Esta fuerte afinidad permitió magnificar la reacción. Después de la incubación se realizó un lavado con solución de TTBS-HS/Tx.

Después del lavado, se aplicó la enzima o cromógeno que permite revelar la reacción inmunológica. En este caso se utilizó una solución de Diaminobencidina (DAB)⁵ con peróxido de hidrógeno durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la aplicación de la enzima, se realizó un lavado con agua desionizada.

⁵ Zymed Laboratories, Inc. 458 Carlton Court. So. San Francisco, CA 94080

Finalmente los tejidos se lavaron con agua destilada, se contrastaron con Hematoxilina de Mayer, se deshidrataron con diferentes concentraciones de alcoholes y las laminillas se prepararon para la observación con el microscopio de luz.

Las muestras se consideraron positivas cuando la totalidad de los microorganismos se tificaron de color café ocre característico.

Utilización de Testigos

Para evaluar el proceso inmunológico y de teñido se utilizaron testigos positivos y negativos. Para los testigos negativos, no se aplicó el anticuerpo anti-*Neospora caninum* durante el proceso y este fue sustituido por suero normal de origen caprino. Los testigos positivos fueron secciones de cerebro de canideo que contenían grupos de taquizoitos de *Neospora caninum*, que demostraron una fuerte reacción positiva al aplicar el anticuerpo primario. Los testigos positivos fueron donados por la Universidad de Saskatoon. La siguiente tabla muestra las laminillas que fueron teñidas, la solución usada y los resultados obtenidos de una prueba válida.

LAMINA	SOLUCION	RESULTADO
Tejido problema	anti- <i>N. caninum</i>	?
Tejido problema	sin anti- <i>N. caninum</i>	Negativo
Positivo comprobado	anti- <i>N. caninum</i>	Positivo

Preparación del Buffer TTBS-HS/Tx:

Tizma-HCL	15.15 gm ⁶
Tizma base	3.47 gm ⁵
Agua desionizada	1000 ml
NaCl	20.29 gm
10% Triton-X	2.5 ml ⁵

Preparación del Buffer Tris 0.05 M, pH 7.6:

Trizma-HCL	3.03 gm ⁵
Trizma base	0.69 gm ⁵
Agua desionizada	500 ml

⁶ Sigma Chemical Company. P.O. Box 14508, St. Louis, Missouri 63178-0016

Encuesta serológica

Con el propósito de detectar vacas afectadas por Neosporosis, se realizó una encuesta serológica para la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* a través de la técnica indirecta de ELISA, para lo cual se muestrearon 1003 sueros de 50 hatos lecheros del Altiplano mexicano comprendiendo los estados de Hidalgo, Coahuila, Estado de México, Puebla, Chihuahua, Aguascalientes, Querétaro, Zacatecas, Jalisco, Durango y Guanajuato. 43 hatos, presentaban alta incidencia de abortos y los 7 hatos restantes no presentaban problemas reproductivos aparentes o se encontraban en los rangos normales, por lo que fueron utilizados como testigo. Para ello se emplearon los reactivos y se siguió el método recomendado por el fabricante⁷ que a continuación se describe:

Metodología

1.- Anticuerpo:

Se colocaron 50 microlitros de anticuerpo (suero) de cada vaca en microplacas de 96 pozos previamente sensibilizada con antígeno de *Neospora caninum*, utilizando una dilución 1:50 con la solución de dilución.

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos.

Las microplacas se lavaron 3 veces con solución de lavado, usando el método tradicional, asegurándose de evitar contaminación cruzada entre los pozos.

2.- Conjugado:

Se colocaron 50 microlitros por pozo de conjugado de cabra anti-IgG1,2 de bovino, peroxidasa de rábano picante (HRPO) diluido 1:100 en solución de dilución.

Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos.

Las microplacas se lavaron nuevamente 3 veces con solución de lavado.

⁷ VMRD, Inc. P.O. Box 502 NW 115 State St. Pullman, WA 99163

3.- Substrato:

Se colocaron 50 microlitros por pozo de substrato de peroxidasa TMB⁸

Las microplacas se incubaron cubriendo con papel de estaño a temperatura ambiente durante 20 minutos. Finalmente se añadieron 50 microlitros de solución para detener la reacción a cada pozo, mezclando suavemente el substrato y la solución.

Para la interpretación, se utilizó un lector de ELISA, con un filtro de λ 620 nm. El pozo A1 se consideró como blanco, los pozos A2 y A3 como testigos positivos y los pozos A4 y A5 como testigos negativos.

4.- Interpretación de resultados :

Se calculó el promedio de los valores de Densidad Óptica (D.O.) de los 2 testigos positivos [(D.O. 1 + D.O. 2) / 2], y éste valor se multiplicó por 0.35 para determinar el 35% de los testigos positivos.

Si las muestras tenían valores $> \text{ó} =$ a 35% de positividad se consideraron como positivas para anticuerpos anti- *Neospora caninum*.

Si las muestras tenían valores $<$ a 35% de positividad, se consideraron negativas para anticuerpos anti- *Neospora caninum*.

Para el análisis de los resultados, se determinó el número y porcentaje de animales seropositivos y seronegativos tanto de los hatos problema como de los hatos control y se obtuvo el índice de probabilidad (Odds Ratio = OR) para establecer la interacción entre la respuesta serológica y el aborto. Para ello, los datos se colocaron en una tabla de contingencia de 2 x 2 y se utilizó la siguiente fórmula: $or = a/c : b/d$. Un índice de probabilidad de 1 indica un riesgo igual con respecto al aborto entre los dos grupos evaluados, índices mayores indican una relación más fuerte entre la seropositividad y el aborto (96, 103, 109).

⁸ Kirkegaard Perry Laboratories. 2 Cessno Court. Gaithersburg, Maryland 20879-4174 USA

Aislamiento y cultivo del parásito

Para el aislamiento del parásito, se siguió el protocolo de aislamiento de Conrad *et. al.* (45). Se practicaron las necropsias de 28 fetos abortados y 2 neonatos sospechosos de la enfermedad. Los encéfalos fueron extraídos en forma aséptica, y la mitad del encéfalo se sometió a estudio histopatológico e inmunohistoquímico para la confirmación de lesiones, taquizoitos o quistes parasitarios. La otra mitad del encéfalo se guardó en solución saturada de fosfatos (PBS), conteniendo 1000 U/ml de penicilina G y 100 mg/ml de estreptomicina⁹ y se refrigeraron a 4° C. Las muestras refrigeradas se mantuvieron por no más de 15 días hasta que la infección por *Neospora caninum* se confirmó a través de la histopatología e inmunohistoquímica. Sólo los casos positivos se procesaron para inóculo en cultivo celular. Las muestras de corazón, músculo esquelético, hígado, pulmón, riñón y bazo sólo fueron procesadas para estudio histopatológico.

Protocolo de aislamiento *in vitro* de *Neospora caninum*

- 1.- La mitad de los cerebros afectados se maceraron con un mortero utilizando 25 ml de PBS estéril con antibióticos¹⁰ y se filtró a través de una gaza estéril.
- 2.- Alicuotas de 2 ml de cerebro homogeneizado se pusieron en 10 ml de tripsina al 0.05% y se incubaron a 37° C durante 1 hora.
- 3.- Después de la tripsinización, se centrifugó a 600 g durante 10 minutos para obtener la pastilla. el sobrenadante se decantó y la pastilla se resuspendió en 3 ml de medio RPMI 1640, suplementado con L-glutamina y 10% de suero fetal de bovino⁹. Se realizaron 2 lavados más, según lo recomendado en el protocolo del primer aislamiento europeo de *Neospora caninum* (110).

⁹ GIBCO BRL Products. Grand Island, NY USA

¹⁰ GIBCO BRL Products. Grand Island, NY USA

4.- Un ml de suspensión de cerebro se colocó en una botella de cultivo de 25 cm², con una monocapa de células Vero (células renales) y otro ml de suspensión de cerebro se colocó en una botella de cultivo de 25 cm², con una monocapa de células L929 (fibroblastos de ratón).

5.- El inóculo se incubó toda la noche a 37°C con 5% de CO₂. La suspensión del cerebro se removió de la botella de cultivo, y la monocapa se lavó 3 veces con PBS estéril antes de adicionar 5 ml de medio de cultivo fresco⁹.

6.- Los cultivos se examinaron todos los días con un microscopio de luz invertida para observar el posible crecimiento del parásito. El medio de cultivo se cambió de 2 a 3 veces por semana y no se realizaron pases de células.

Para la confirmación de un posible aislamiento se utilizó el siguiente método:

Las células del cultivo positivo se removieron con una solución de tripsina al 0.05%⁹, se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos, se lavaron con PBS⁹ estéril y se centrifugaron 2 veces más. La pastilla obtenida, se distribuyó en varias laminillas, de las cuales la mitad se fijaron en alcohol para estudio inmunohistoquímico previamente descrito y la otra mitad se fijaron en acetona para estudio de inmunofluorescencia utilizando un antisuero policlonal anti-*Neospora caninum* conjugado con isotiocianato de fluoresceína y siguiendo el método recomendado por el fabricante¹¹ que a continuación se describe:

1.- después de la fijación en acetona, las laminillas se secaron por 10 minutos a 37 °C.

2.- Se aplicó de 50 a 75 µl de conjugado durante 30 minutos a 37° C en cámara húmeda.

3.- Las laminillas se lavaron delicadamente con solución con p.H. 9.0 y permanecieron en esta solución durante 10 minutos.

4.- Las laminillas se secaron. se montaron con glicerol y se observaron con un microscopio de luz ultravioleta.

¹¹ VMRD, Inc. P.O. Box 502 NW 115 State St. Pullman, WA 99163

Análisis de resultados

De los 211 fetos muestreados en los diferentes estados del Altiplano mexicano para estudio histopatológico, se obtuvo la frecuencia con la que se detectó la presencia de *Neospora caninum* y/o lesiones características asociadas a él, considerando el tipo, número y porcentaje de lesiones características de Neosporosis presentes en los diversos órganos e intensidad o grado de la lesión, clasificándose en discreta cuando la presencia de células inflamatorias o focos gliales en encéfalo eran escasas con o sin necrosis, severa, cuando la presencia de células inflamatorias o focos gliales eran abundantes con o sin necrosis y moderada, cuando la cantidad de células inflamatorias o focos gliales era intermedia entre el grado discreto y severo con el objetivo 10 X (100 aumentos). También se determinó el número y porcentaje de fetos con lesiones compatibles con infección bacteriana, basándose en el tipo de lesiones que las bacterias ocasionan comúnmente en los fetos tales como bronconeumonías e infiltrados supurativos en diversos órganos, así como el número y porcentaje de fetos con lesiones compatibles con infección viral, basándose en el tipo de lesiones que los virus ocasionan comúnmente en los fetos tales como necrosis hepática multifocal, inclusiones virales, y meningitis no supurativa entre otras. Para el estudio inmunohistoquímico se obtuvo el número y porcentaje de 53 de 73 (73%) casos con lesiones características de Neosporosis, basándose en la reacción positiva para la identificación de taquizoitos o quistes en el encéfalo y la presencia de taquizoitos en el miocardio e hígado. Para la encuesta serológica, se determinó el número de sueros positivos y negativos por estado de los 50 hatos, así como el número y porcentaje de animales seropositivos y seronegativos tanto de los hatos problema como de los hatos testigo y se analizaron utilizando el índice de probabilidad (OR). Para el aislamiento del parásito, de los 30 casos trabajados, sólo 13 (43%) fueron procesados para aislamiento ya que fueron los que presentaron lesiones características de Neosporosis en encéfalo.

RESULTADOS:

Histopatología

Los resultados del estudio histopatológico se resumen en los Cuadros 1 y 2 en donde se indica el número de fetos estudiados por estado y su diagnóstico, así como el tipo, número y porcentaje de lesiones características de Neosporosis encontradas según su grado de severidad respectivamente. De los 211 fetos, en 104 (49.28%), se pudo identificar la causa de aborto y en los otros 107 (50.71%) no se pudo determinar debido a que no presentaban ninguna lesión o los tejidos se encontraban autolizados, lo que dificultó la interpretación histológica. De los 104 fetos, en 73 (70.19%), se encontraron lesiones características de Neosporosis. 28 (26.92%) presentaron lesiones compatibles con infección bacteriana principalmente bronconeumonías con o sin bacterias y en 3 (2.88%), se encontraron lesiones compatibles con infección viral, 2 con Diarrea Viral Bovina al encontrarse meningitis y neuritis del nervio óptico y 1 con Rinotraqueítis Infecciosa Bovina al encontrarse necrosis hepática multifocal con inclusiones intranucleares. Las lesiones más significativas y constantes asociadas a Neosporosis se apreciaron en el miocardio, encéfalo, hígado y músculo esquelético. Cincuenta y ocho fetos (79.45%), presentaron miocarditis no supurativa multifocal o difusa de grado variable siendo el más frecuente el discreto, seguido por el moderado y el menos frecuente, el severo (Figura 1). En ningún caso se apreciaron taquizoitos en las fibras musculares con la tinción de rutina. Treinta y nueve fetos (53.42%), presentaron en encéfalo focos de gliosis y necrosis y en algunas ocasiones los focos de necrosis se rodeaban de células gliales y linfocitos con tendencia a formar granulomas (Figuras 2 y 3). No se encontró una localización de lesiones anatómica característica, sin embargo, éstas lesiones se encontraron con mayor frecuencia en la corteza cerebral, fueron multifocales y frecuentemente se encontraron cerca de vasos sanguíneos (Figura

4). En un caso, se apreció infiltrado linfocitario perivascular. Sólo en 6 fetos (8.21%) se apreciaron quistes parasitarios de diferentes tamaños con múltiples bradizoitos en su interior de forma oval a redonda intraneuronales o extraneuronales de pared gruesa, siendo PAS positivos, los cuales fluctuaron de 21 x 21 μm el más pequeño hasta 49.5 x 33 μm el más grande (Figura 5). Sólo en un caso se observó reacción inflamatoria alrededor de un quiste con cambios degenerativos. Con la tinción de H.E. no fue posible detectar taquizoitos libres o en grupos. El grado de lesión también fue variable, siendo el más frecuente el discreto, seguido por el moderado y el menos frecuente el severo. Cabe señalar que sólo se contó con 44 cerebros de los 73 casos (60%) debido a que los 29 restantes no fueron remitidos al laboratorio. Treinta y nueve fetos (53.42%), presentaron hepatitis periportal no supurativa también de grado variable siendo el más común el discreto, y en algunas ocasiones se encontraron focos de necrosis distribuidos al azar (Figuras 6 y 7). No se identificaron estructuras parasitarias con la tinción de rutina. Diecinueve fetos (26.02%), presentaron miositis no supurativa multifocal por lo general de grado discreto y tampoco se identificaron estructuras parasitarias. Cabe señalar también que sólo se contó con el tejido muscular esquelético de 20 fetos (27%), ya que las 53 muestras restantes de éste tejido, tampoco fueron remitidas al laboratorio. Sólo en 3 casos (4.10%), se apreció una reacción inflamatoria discreta en pulmón, compuesta por macrófagos alveolares y algunos linfocitos, que no se consideró significativa. En las secciones de riñón y bazo, no se encontraron alteraciones significativas.

Se pudo obtener las frecuencias por edad y sexo de sólo 47 de los 73 fetos (64%)s con lesiones características de Neosporosis, las cuales se resumen en el Cuadro 3.

CUADRO 1

CAUSAS DE ABORTO IDENTIFICADAS POR HISTOPATOLOGÍA EN DIFERENTES ESTADOS DE MÉXICO

Estado	Neosporosis	Bacteriano	Viral	Ident.	%	No Ident.	%
Hidalgo	38	21	0	59	53	53	47
Coahuila	29	2	0	31	57	23	43
Querétaro	1	3	0	4	22	14	78
Guanajuato	1	1	0	2	29	5	71
Durango	0	1	1	2	29	5	71
Aguascalientes	2	0	1	3	50	3	50
Jalisco	0	0	1	1	50	1	50
Edo. de Méx.	1	0	0	1	50	1	50
Tamaulipas	0	0	0	0	0	1	100
Tlaxcala	1	0	0	1	100	0	0
Chihuahua	0	0	0	0	0	1	100
TOTAL	73	28	3	104	49	107	51

CUADRO 2**TIPO DE LESIÓN Y SEVERIDAD EN DIVERSOS ÓRGANOS
(NÚMERO DE CASOS Y PORCENTAJE)**

Intensidad o grado	Gliosis/Necrosis	Miocarditis	Hepatitis	Miositis
Discreta	28 (72%)	26 (45%)	26 (67%)	11 (58%)
Moderada	9 (23%)	21 (36%)	11 (28%)	6 (32%)
Severa	2 (5%)	11 (19%)	2 (5%)	2 (10%)
TOTAL	39	58	39	19

CUADRO 3**FRECUENCIAS POR EDAD Y SEXO DE 47 FETOS CON LESIONES
CARACTERÍSTICAS DE NEOSPOROSIS**

Promedio de edad gestacional	5.46 meses
Moda	5 meses
Mediana	5 meses
Edad mayor	8 meses
Edad menor	3 meses
No. de machos	26
No. de hembras	21
Total	47

Inmunohistoquímica

Los resultados de este estudio se resumen en el Cuadro 4 en donde se indica el número y porcentaje de casos positivos y negativos en encéfalo, miocardio e hígado. De los 53 de los 73 fetos (73%) con lesiones características de Neosporosis a los que se les practicó inmunohistoquímica en encéfalo, miocardio e hígado, se pudieron identificar antígenos parasitarios en 41 fetos (78%), de los cuales en 19 (46%), se localizaron en 1 órgano, en 15 (37%), en dos órganos y en 7 (17%) en los 3 órganos estudiados. En lo que respecta a encéfalo, solamente en 2 casos (4%) se identificaron quistes parasitarios, los que se tiñieron completamente de color café ocre y en ningún caso se encontraron lesiones asociadas a ellos (Figura 8). Taquizoitos fueron identificados en 19 casos (36%) encontrándose aislados o principalmente en grupos asociados o no a focos de gliosis y necrosis (Figura 9). En miocardio se identificaron taquizoitos en 24 casos (45%) principalmente dentro del sarcoplasma y asociados a infiltrado inflamatorio y/o áreas de necrosis (Figura 10). En un caso, se identificó un quiste dentro de una célula nerviosa propia de la inervación del miocardio (Figura 11). Con lo que respecta al hígado, se identificaron grupos de taquizoitos generalmente asociados a focos de necrosis en 25 fetos (47%) (Figura 12). En el hígado se encontraron con mayor frecuencia taquizoitos, seguido por el encéfalo y menos frecuentes en el miocardio.

En algunos casos no se practicó la inmunohistoquímica en 1 o 2 órganos, debido a que no se contó con ellos o a que se encontraban en mal estado de conservación.

CUADRO 4

**INMUNOHISTOQUIMICA PARA *Neospora caninum* EN ENCÉFALO, MIOCARDIO
E HÍGADO DE 53 FETOS CON LESIONES CARACTERÍSTICAS DE
NEOSPOROSIS**

	Encéfalo				Miocardio		Hígado	
	Taquizoitos		Quistes		Taquizoitos		Taquizoitos	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Positivo	19	36	2	4	24	45	25	47
Negativo	17	32			24	45	16	30
No determinado	15	28			5	10	12	23
TOTAL	53				53		53	

Encuesta serológica

Los resultados de la encuesta serológica se resúmen en los Cuadros 5 y 6 en donde se indica el número de sueros positivos y negativos estudiados por estado de los 50 hatos, así como el número y porcentaje de animales seropositivos y seronegativos tanto de los hatos problema como de los hatos testigo. De los 1003 sueros estudiados en los 50 hatos, 561 (56%) resultaron positivos y 442 (44%) negativos. Los resultados de los hatos problema y testigo fueron los siguientes: En los hatos problema, 404 sueros (72%) resultaron positivos y 159 sueros (28%) resultaron negativos, mientras que en los hatos testigo, 157 sueros (36%) resultaron positivos y 283 sueros (64%) resultaron negativos. El índice de probabilidad (OR= Odds Ratio) fue de 4.5 (3.49, 5.47) con 95% de confianza, lo que indica que la probabilidad de abortar en los hatos problema en este caso es de 4.5 veces más que en los hatos control, por lo que se concluye que existe una fuerte asociación entre la seropositividad hacia la presencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* y el aborto.

CUADRO 5

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI- *Neospora caninum* EN 50 HATOS DEL ALTIPLANO MEXICANO

Estado	Total de Hatos	No. de Hatos Problema	No. de Hatos Control	No. Total de Sueros	No. y % de Sueros positivos	No. y % de Sueros Negativos
Hidalgo	23	22	1	262	189 (72)	73 (28)
Coahuila	5	4	1	191	89 (47)	102 (53)
Edo. de México	5	4	1	174	102 (59)	72 (41)
Puebla	4	2	2	115	45 (39)	70 (61)
Chihuahua	2	2	0	40	25 (63)	15 (37)
Aguascalientes	4	3	1	145	58 (40)	87 (60)
Querétaro	3	3	0	34	24 (71)	10 (29)
Zacatecas	1	1	0	20	13 (65)	7 (35)
Jalisco	1	1	0	12	11 (92)	1 (8)
Durango	1	0	1	5	1 (20)	4 (80)
Guanajuato	1	1	0	5	4 (80)	1 (20)
TOTAL	50	43	7	1003	561 (56)	442 (44)

CUADRO 6

DISTRIBUCIÓN DE LA SEROPOSITIVIDAD EN HATOS PROBLEMA Y HATOS TESTIGO (NÚMERO Y PORCENTAJE)

	Hatos Problema		Hatos Testigo		TOTAL
	No.	%	No.	%	
Seropositivos	404	(72)	157	(36)	561
Seronegativos	159	(28)	283	(64)	442
TOTAL	563		440		1003

OR (95% Intervalo de Confianza) = 4.5 (3.49, 5.47)

Como resultados complementarios, se analizaron 32 sueros de vacas incluidos en la encuesta serológica a cuyos fetos se les practicó histopatología, y se determinó la correlación de los resultados de serología e histopatología, así como la sensibilidad y especificidad de los resultados serológicos con respecto a los resultados de histopatología. Los resultados se resumen en la siguiente tabla de contingencia de 2 x 2.

CUADRO 7

CORRELACIÓN DE 32 CASOS POR HISTOPATOLOGÍA Y SEROLOGÍA

	Con lesiones	Sin lesiones	TOTAL
Seropositivos	21	8	29
Seronegativos	1	2	3
TOTAL	22	10	32

Sensibilidad = 95%

Especificidad = 20%

De los 21 casos de vacas seropositivas y cuyos fetos tenían lesiones características de Neosporosis, y que además se les practicó inmunohistoquímica, en 17 de ellos (81%) se identificaron antígenos parasitarios.

Aislamiento *in vitro* y características de crecimiento

De los 30 casos trabajados para aislamiento, extrayendo el encéfalo en forma aséptica, sólo en 13 (43%), se identificaron lesiones de Neosporosis, quistes parasitarios o ambos; y éstos fueron trabajados para aislamiento. Únicamente en un cultivo hubo crecimiento de taquizoitos. Este aislamiento exitoso se obtuvo a partir del encéfalo de un feto de 7 meses de gestación, macho, el cual no presentaba lesiones microscópicas detectables en ningún órgano, sin embargo se encontró un quiste parasitario de 22 x 23.1 μm el cual se encontraba en buen estado de conservación al igual que el tejido nervioso por lo que se decidió trabajarlo para aislamiento, aunque no se detectaron antígenos parasitarios con la inmunohistoquímica. A los 15 días de incubación, se detectaron alteraciones tanto de las células Vero como en las L929. Estas alteraciones consistieron en la presencia de vacuolas citoplasmáticas de diferentes tamaños y la tendencia de las células de cambiar de alargadas a esféricas. A los 23 días después de la inoculación de las células, se apreció una moderada cantidad de taquizoitos, los cuales salían de algunas células y nadaban en el medio de cultivo con movimientos amiboidcos (Figura 13). En otras células se apreciaba movimiento dentro de vacuolas citoplasmas. Algunos taquizoitos extracelulares aparentemente se encontraban unidos. Después del día 23, se apreció un buen crecimiento de taquizoitos y solamente se agregó medio de cultivo fresco (RPMI 1640 con 5% de suero fetal), 3 veces por semana sin agregar células nuevas. Los taquizoitos libres en los medios de cultivo de desecho, se utilizaron para infectar a nuevas monocapas de células y

aparentemente se tuvo éxito, sin embargo y desafortunadamente, alrededor de los 2 meses de la detección de los parásitos, se detectó un decremento en el crecimiento de estos hasta llegar a perderse. Para la confirmación del aislamiento, se practicó inmunohistoquímica e inmunofluorescencia de cultivos infectados a partir de la remoción de las células de las botellas de cultivo y ambas pruebas resultaron positivas. En la inmunohistoquímica se apreció una moderada cantidad de taquizoitos principalmente extracelulares con la clásica forma de “coma” y teñidos por completo de color café ocre (Figuras 14 y 15). En la inmunofluorescencia se apreció también una moderada cantidad de taquizoitos detectados por la luz ultravioleta los que presentaban forma característica (Figura 16). En algunos de los inóculos en los cuales no hubo crecimiento, sólo se apreciaron cambios citopáticos en las células, probablemente debido a envejecimiento.

DISCUSIÓN:

Los resultados del estudio histopatológico, son muy semejantes a lo indicado en la literatura mundial y puede concluirse que los tejidos que se afectan con mayor frecuencia y que nunca deben faltar para un buen diagnóstico de Neosporosis son SNC, el tejido muscular cardíaco y esquelético, y el hígado (11,13,14,72,73).

La miocarditis no supurativa fue la lesión más frecuente encontrándose en 58 fetos y el grado de lesión más común en este tejido fue el discreto. Barr *et al.* (13), Dubey y Lindsay (19) y Wouda *et al.* (90), indican que en general la miocarditis tiende a ser severa, sin embargo esta se enmascara fácilmente por cambios autolíticos y que con frecuencia el grado de autólisis es mayor que en otros órganos. A diferencia de este estudio, en la mayoría de los casos la miocarditis fue discreta, sin embargo, en algunos casos también había autólisis avanzada. En ningún caso fue posible la identificación de taquizoitos en las fibras musculares con la tinción de rutina, lo cual demuestra una vez más la dificultad que se tiene para identificar con seguridad las estructuras parasitarias sin utilizar la inmunohistoquímica. En estudios previos, sólo se informa de la presencia de taquizoitos en fibras musculares del miocardio (72) y no de la presencia de quistes parasitarios en células nerviosas, sin embargo, en este estudio se logró encontrar un quiste parasitario en una de éstas células en un feto proveniente de gestación gemelar de 8 meses, que fue identificado a través de la inmunohistoquímica. Este hallazgo se considera de importancia y se sugiere tomarle en cuenta para el diagnóstico. Aparentemente es más fácil identificar taquizoitos en neonatos que en fetos, con tinción de rutina.

Las lesiones en SNC por lo general fueron de discretas a moderadas y de distribución multifocal. Con anterioridad, en la literatura mundial no se había informado de una localización anatómica específica de lesiones en SNC (19), sin embargo en este estudio, se localizaron con mayor frecuencia en la corteza del encéfalo, lo cual es semejante a lo recientemente encontrado por

Helman *et al.* (111), quienes realizaron un estudio histopatológico con énfasis en la distribución de lesiones en el encéfalo en 6 fetos, encontrando que las lesiones se localizan de mayor a menor frecuencia en el cerebro, médula oblongada y cerebelo. Los quistes parasitarios, concordando con lo informado por otros autores (8,19), fueron escasos y la mayoría exceptuando uno, no presentaban reacción inflamatoria por parte del huésped lo cual indica que posiblemente éstos estaban viables e íntegros antes de la muerte del feto, sin embargo frecuentemente no se conservan en buen estado debido a la autólisis. Posiblemente en el único quiste en el que se apreció reacción inflamatoria no supurativa alrededor de él, se deba a que hubo ruptura de su pared, dejando escapar antígenos que fueron reconocidos por el sistema inmunológico, lo cual también es propuesto por Dubey (8,9) y Dubey *et al.* (21). En la mayoría de los fetos, sólo se encontraron focos necróticos y reacciones gliales e inflamatorias asociadas o no, a la presencia de estructuras parasitarias, sin encontrarse una reacción inflamatoria no supurativa perivascular franca, lo que sugiere que el sistema inmunológico de estos fetos no detectó del todo a los parásitos. Sólomente en un caso, se apreció infiltrado linfocitario perivascular encontrándose en el feto de mayor edad, lo que puede estar asociado a la madurez del sistema inmunológico en este feto. explicación previamente propuesta por Ogino *et al.* (54). Desafortunadamente en el presente estudio no se contó con muestras de médula espinal, ya que algunos investigadores indican que es un lugar en donde se pueden encontrar con frecuencia quistes parasitarios y lesiones de Neosporosis (19,38). En ningún caso se encontraron hemorragias en el parénquima cerebral, hallazgo que si ha sido indicado por Dubey *et al.* (69) y Dubey y Lindsay (73).

El hígado fue otro de los órganos afectado y frecuentemente asociado a lesiones nerviosas y musculares. La hepatitis no supurativa con tendencia periportal, se consideró muy característica ya que esta distribución fue consistente en todos los casos y solamente en pocos casos se acompañó de focos de necrosis. Barr *et al.* (13) identificó 2 patrones de inflamación en el

hígado, en 43 de 77 fetos (56%) el infiltrado inflamatorio fue periportal y en 27 de 77 fetos (35%) hubo necrosis hepatocelular. En pocos casos se encontraron ambas lesiones juntas, al igual que en el presente estudio.

El muestreo de músculo esquelético se consideró relevante para el diagnóstico de Neosporosis en este estudio, ya que en 19 de 20 casos en los que se pudo obtener muestras de este tejido, se encontró miositis no supurativa independientemente de la localización de la muestra, por lo que se sugiere revisar este tejido en casos sospechosos de Neosporosis. En ninguna de las muestras se encontraron estructuras parasitarias con la tinción de rutina.

Por otra parte, el promedio de edad gestacional de los 47 fetos de los cuales se pudo obtener este dato, fue de 5.46 meses, siendo igual al registrado por Anderson *et al.* (12) en California. Esto confirma una vez más que el aborto en esta enfermedad se presenta con mayor frecuencia entre el cuarto y sexto mes de gestación. Los 2 fetos de menor edad en este estudio tenían 3 meses de gestación y hasta la fecha, no se ha registrado el aborto en fetos de menor edad, sin embargo, Dubey y Lindsay (19), indican que esto se puede atribuir a que los productos de uno y 2 meses de gestación que probablemente mueran en el útero, pueden ser reabsorbidos y las vacas podrían entrar en estro otra vez.

En lo que respecta al estudio inmunohistoquímico, se puede concluir que fue de gran ayuda para el diagnóstico, resultando ser una técnica confiable con la que se identificaron antígenos parasitarios en 41 de 53 fetos estudiados (78%), encontrándose positividad por lo menos en un órgano. Este porcentaje es parecido al encontrado por Wouda *et al.* (90) quienes a través de la inmunohistoquímica confirmaron la presencia del parásito en 68 de 80 fetos estudiados (85%).

El hígado fue el tejido en el que se identificaron antígenos parasitarios con mayor frecuencia y en mayor cantidad, encontrándose en 25 casos de 41 hígados estudiados (61%). Esto indica que en este tejido existen grandes posibilidades de identificar con facilidad antígenos parasitarios

Los grupos de taquizoitos se encontraron asociados o no, a la reacción inflamatoria o a la necrosis. El encéfalo fue un órgano importante para confirmar la presencia de grupos de taquizoitos principalmente y quistes parasitarios, y aunque estos fueron escasos se pudieron identificar en 22 de 38 encéfalos estudiados (58%). En los dos casos en los cuales se identificaron quistes parasitarios, estos se encontraban sin ninguna reacción inflamatoria o glial alrededor. Los taquizoitos se encontraron asociados o no, a lesiones necróticas, inflamatorias o gliales. En el miocardio fue en donde con menor frecuencia se pudieron identificar antígenos parasitarios a través de la inmunohistoquímica ya que sólo se identificaron estructuras parasitarias en 24 de 48 casos (50%), esto posiblemente se deba a que el miocardio se autoliza con facilidad y dificulta el diagnóstico inmunohistoquímico. Por otra parte a través de la inmunoperoxidasa se pudo identificar un quiste parasitario en una célula nerviosa propia de la innervación del miocardio, hallazgo que no se había informado con anterioridad.

Estos resultados difieren un poco con respecto a lo encontrado por Wouda *et al.* (90) en el cerebro e hígado, ya que el porcentaje de positividad a través de la inmunohistoquímica fue mayor en el encéfalo (89%) que en el hígado (26%). sin embargo el presente estudio y el de Wouda *et al.* (90) son semejantes en lo que respecta a los resultados obtenidos en el miocardio, ya que fue el tejido en donde se identificaron con menor frecuencia antígenos parasitarios (14%). De acuerdo a los resultados del presente estudio se sugiere que en caso de encontrar lesiones microscópicas características de Neosporosis se practique la inmunohistoquímica en el cerebro, el hígado y el miocardio, ya que además de ser los órganos más afectados se incrementa la posibilidad de identificar estructuras parasitarias en por lo menos uno de éstos órganos y así poder confirmar que la causa del aborto se asoció realmente a Neosporosis.

Además, estudios previos realizados por Lindsay y Dubey (5), indican que el método del Complejo Avidina Biotina Peroxidasa (CABP) utilizando anticuerpos primarios específicos,

puede diferenciar estructuras parasitarias de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, siendo una técnica altamente específica para *Neospora caninum*. Sin embargo, se tiene que tomar en cuenta que el éxito de la técnica de inmunoperoxidasa dependerá de factores tales como tiempo de fijación de los tejidos en formalina al 10%, grado de autólisis de los tejidos, la cantidad de antígenos presentes y aspectos técnicos tales como tiempos de incubación durante el desarrollo de la técnica y el grado de digestión de los tejidos por tripsina o pepsina entre otros (19, 112).

En lo que respecta a la encuesta serológica, se demostró claramente que la enfermedad está ampliamente difundida en México, al encontrarse una seropositividad elevada (72%) en hatos con problemas reproductivos, además de que en los hatos en los cuales aparentemente no se presentaba alta frecuencia de abortos, también se encontró seropositividad del 35%. lo cual indica que animales seronegativos se encuentran en riesgo de ser infectados en cualquier momento, en caso de que el agente etiológico se encontrara en el medio ambiente, aunque no ha sido demostrado. El índice de probabilidad (OR) de 4.5 en este estudio indicó una fuerte asociación entre la seropositividad anti-*Neospora caninum* y el aborto, esto es de tomarse en cuenta porque aunque no todas las vacas seropositivas abortan, algunos estudios indican que el riesgo de aborto de una vaca infectada puede ser de 2 hasta 6 veces mayor que las vacas no infectadas dentro del mismo hato, considerándose como aborto endémico (65,103). Por otra parte, estudios realizados por Paré *et al.* (65,113) demuestran que la infección congénita ocurre entre el 78 y el 90% de las vacas seropositivas, al determinar anticuerpos en suero de becerros pre-calostrados nacidos de madres seropositivas. En otro estudio seroepidemiológico realizado en 4 hatos, 2 con aborto epidémico (hatos 1 y 2) y 2 con aborto endémico (hatos 3 y 4), se encontró seropositividad en 20 de 34 vacas (58.8%) que habían abortado y en 8 de 45 vacas (17.17%) que no habían abortado en los hatos 1 y 2, mientras que para los hatos 3 y 4, 10 de 12 vacas (83.3%) con Neosporosis confirmada, tuvieron becerros seropositivos y solamente 1 de 28

vacas seronegativas (3.6%) tuvieron becerros seropositivos. Los autores sugieren que las vacas que abortaron un feto infectado con *Neospora caninum*, probablemente se habían infectado por vía congénita y que el aborto no había sido consecuencia fue una consecuencia de una exposición reciente al agente presente en el medio ambiente (114). Estos autores encontraron también una baja incidencia de infección posnatal por *Neospora caninum* en la evaluación de 2 hatos en California (1.1% y 2.3%).

Tomándose como resultados verdaderos los de histopatología, con respecto a la correlación observada en 32 casos, entre el estudio histopatológico en fetos y el serológico en sus madres (Cuadro 7), se obtuvo una sensibilidad del 95% y una especificidad del 20%. Esto indica que la mayoría de las vacas con fetos que presentaron lesiones características de Neosporosis, resultaron seropositivas (21/22), y que en menor medida en fetos que fueron abortados de madres seropositivas, no fue posible detectar lesiones (8/29). Por otro lado, en 17 de los 21 fetos (81%) cuyas madres fueron seropositivas y que presentaron lesiones características de Neosporosis (Cuadro 7), fue posible detectar antígenos parasitarios a través de la inmunohistoquímica por lo menos en un órgano, por lo que se puede concluir en este estudio, que la técnica de ELISA fue de gran utilidad para identificar animales infectados y que existe una buena correlación entre ésta técnica y la histopatología positiva y a su vez entre la histopatología y la inmunohistoquímica pudiendo confirmar que el aborto se atribuyó a Neosporosis, sin embargo en caso de no encontrar lesiones en el feto, no se puede asegurar de que el aborto se asoció a Neosporosis, aunque es probable que la vaca esté infectada. Esto podría deberse a varios factores tales como: que los parásitos no habían llegado al feto, la dosis infectante fue baja, no se hubieran multiplicado en forma activa provocando necrosis, no fueron reconocidos quizá por utilizar mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica del huésped, a que el proceso de autólisis enmascaró las lesiones en caso de ser leves, a que las muestras no

fueron representativas y finalmente a un resultado falso positivo de la técnica de ELISA. En el único caso en donde el resultado serológico fue negativo y se encontraron lesiones en el feto, podría considerarse un estado de inmunosupresión de la madre al momento de tomar la muestra para el análisis. En resumen se podría concluir que el encontrar lesiones características de Neosporosis en fetos, así como antígenos parasitarios a través de la inmunohistoquímica en estos fetos aún sin saber el estado inmunológico de la madre es una prueba altamente confiable de que esta está infectada, sin embargo el no encontrar lesiones en el feto abortado de una madre seropositiva no significa que esta no está infectada. Cabe mencionar que los reactivos utilizados para la realización de la ELISA en este estudio, refieren una sensibilidad relativa del 96.9% y una especificidad relativa de 97.8%, determinadas a través de la comparación de resultados de ésta técnica e IF de 413 animales estudiados, siendo 134 positivos por IF¹². Los resultados de este estudio varían un poco con respecto a lo encontrado en un estudio realizado en 1996 por Reichel y Drake (96), cuyo objetivo fue comparar los resultados de histopatología y serología a través de ELISA e IF de 119 fetos, sueros maternos y fluidos fetales, en donde la correlación (K= Kappa) entre ELISA en fluidos fetales e histopatología fue de $K= 0.37$; e IF en fluidos fetales e histopatología de $K= 0.39$, considerándose como pobre en ambos casos. Sin embargo existió un alto grado de correlación entre los resultados de ELISA e IF en fluidos fetales siendo de $K=0.96$ y también una buena correlación $K = 0.79$ entre ELISA e IF de sueros maternos con respecto a fluidos fetales. En este estudio se comenta que la poca correlación entre la histopatología y la serología del feto se puede deber a varios factores: Serología negativa e histopatología positiva se puede asociar al estado inmunocompetente del feto o la poca edad gestacional en donde no es posible detectar niveles de anticuerpos anti- *Neospora caninum* antes de presentarse el aborto. Esta explicación también es sustentada por Barr *et al.* (92) en estudios

¹² Comunicación personal de Thomas P. Kellner, D.V.M. Marketing and Technical Services, VMRD, Inc

realizados en California, quienes encontraron que la seropositividad está relacionada directamente con la edad gestacional, en donde fue menor (21%) en fetos hasta de 5 meses de gestación y mayor (93%) en fetos entre 8 y 9 meses de gestación. Mientras que serología positiva e histopatología negativa puede deberse a que no se detectaron pequeñas lesiones focales en el feto debido a un estado avanzado de autólisis de los tejidos o a la selección de la muestra y número de cortes analizados. Los autores también comentan que una vaca seropositiva no siempre aborta o que otros agentes causales también pueden estar implicados en el aborto de una vaca reactiva a *Neospora caninum*. Al respecto Thurmond y Hietala (96), indican que teóricamente otras condiciones o enfermedades pueden afectar el estado inmunológico de la vaca y favorecer la exposición del feto a los taquizoitos de *Neospora caninum*, aunque esto no ha sido demostrado. Ejemplos de estas enfermedades podrían ser Diarrea Viral Bovina o la exposición a micotoxinas. Los autores también mencionan que el encontrar *Neospora caninum* en los fetos da una idea de la prevalencia de este agente en el hato y que no necesariamente es el agente causal primario del aborto, y por otro lado el estado serológico del hato debe ser utilizado para obtener información del riesgo de aborto atribuible a infección por *Neospora caninum* (96). Es preciso señalar que en algunos casos de becerros con y sin signología nerviosa, seropositivos y provenientes de madres infectadas seropositivas, no se encuentran lesiones visibles al microscopio óptico, esto podría deberse a que hubo una exposición del feto al agente en útero en una edad gestacional temprana o a la utilización de posibles mecanismos de evasión de la respuesta inmune utilizados por el parásito que impidan su identificación a nivel de los tejidos. Existe una publicación en la cual se describe el primer aislamiento exitoso de *Neospora caninum in vitro* en Suecia proveniente de un becerro seropositivo, en el cual no se encontraron lesiones histológicas en ningún órgano y tampoco se identificaron estructuras parasitarias con la técnica de inmunohistoquímica (82).

Con lo que respecta al aislamiento del agente, existen escasos informes al respecto a nivel mundial por lo que el aislamiento exitoso realizado en México, se consideró de gran importancia. El éxito de este aislamiento se atribuye a varios factores los cuales ya fueron expuestos previamente por Dubey y Lindsay (19) Conrad *et al.* (45) y Stenlund *et al.* (82) Algunos de los factores que posiblemente contribuyeron de manera sustancial en el aislamiento fueron los siguientes: la edad gestacional del feto. Dubey y Lindsay (19) indican que el aislamiento puede ser más exitoso si se realiza a partir de fetos a término o en neonatos debido a que en éstos existe mayor probabilidad de encontrar quistes parasitarios en SNC, siendo más resistentes y posiblemente vivan más que los taquizoitos en otros tejidos. En este caso, el feto fue de 7 meses de gestación. Otro de los factores que se consideró relevante fue que el encéfalo a partir del cual se realizó el inóculo estaba en buen estado de conservación y además el quiste parasitario que se localizó a través de la histopatología no presentaba reacción inflamatoria o glial alrededor de él y no se encontraron lesiones significativas en ningún órgano. lo que indica que se encontraba aún en buen estado al momento del aborto. Al respecto Conrad *et al.* (45) comenta que un requisito importante para lograr el aislamiento es que en el tejido encefálico exista un grado mínimo de autólisis. Otro factor que se consideró importante fue que el inóculo se realizó a los 5 días de haber extraído el encéfalo en forma aséptica y éste conservó a temperatura de 4°C en PBS con antibióticos, lo que retardó la descomposición y evitó la contaminación microbiana. El tiempo que transcurre desde el momento del aborto hasta la preparación del inóculo se considera de vital importancia ya que entre menos tiempo transcurra entre estos dos eventos existe mayor posibilidad de encontrar parásitos viables. Lindsay *et al.* (115) comentan que los quistes parasitarios pueden permanecer viables por 14 días a temperatura de 4°C. Finalmente otro factor que se consideró de importancia fue que el cultivo celular no se contaminó con otros microorganismos. Es preciso señalar que los taquizoitos se apreciaron a los 23 días pos-

inoculación en ambas líneas celulares (células Vero y L929), lo que indica que los parásitos se pudieron adaptar a ambas líneas celulares. Al respecto Dubey y Lindsay (19) comentan que los taquizoitos de *Neospora caninum* pueden crecer en varias líneas celulares y aparentemente el tipo de línea celular escogida no es crítico para el éxito del aislamiento. En este aislamiento se puede reforzar este concepto. Desafortunadamente no se pudo mantener el crecimiento de los parásitos en los cultivos celulares ya que después de una buena multiplicación obtenida al mes de su identificación ésta empezó a declinar hasta llegar a perderse a los 2 meses. Esto se puede atribuir principalmente a que no se tuvo un adecuado manejo de los cultivos celulares, ya que no se realizaron pases de células y en vez de esto se utilizaron taquizoitos libres en los medios de cultivo de desecho para infectar nuevas células. Otros factores que se consideran que pudieron afectar el crecimiento de los parásitos son variaciones en la temperatura y CO₂ de la incubadora utilizada, además de que probablemente las líneas celulares utilizadas presentaban envejecimiento. El aislamiento en los otros 12 casos trabajados, no fue posible probablemente por razones previamente sustentadas por Conrad *et al.* (45) y Dubey y Lindsay (19) que se pueden resumir en las siguientes: el aislamiento en cultivo celular es difícil debido a que los fetos generalmente se encuentran parcial o severamente autolizados al momento del aborto y probablemente en el proceso de autólisis también mueran parásitos viables, además de que el número de parásitos presentes en el SNC generalmente es escaso y solamente se utiliza una pequeña porción de tejido encefálico para el inóculo. Por otro lado los cultivos celulares son sensibles a las variaciones ambientales de incubación y finalmente a que existe un alto riesgo de contaminación microbiana al momento del manejo de éstos cultivos. En estos intentos fallidos se presentó al menos uno de los factores antes mencionados. Otro método de aislamiento del parásito que se ha practicado, es a través de la inoculación intracerebral en ratones a partir de tejido encefálico de feto (116) y a partir del cerebro de un becerro infectado congénitamente

(60), aparentemente este método reduce el riesgo de contaminación bacteriana.

De acuerdo a los resultados de este trabajo de investigación se puede concluir en forma general que la Neosporosis bovina se encuentra ampliamente difundida al menos en las principales cuencas lecheras del país, hecho sustentado al encontrar lesiones características de la enfermedad en los fetos, así como la identificación del parásito a través de la inmunohistoquímica y el aislamiento del agente en cultivo celular a partir de tejido encefálico de un feto, además de encontrar evidencia serológica positiva en alto porcentaje en hatos con alta frecuencia de abortos. Se presume que la enfermedad se difundió a México principalmente debido a la importación de ganado lechero proveniente de países con alta prevalencia de Neosporosis, y además debido a la transmisión congénita del agente. La enfermedad aparentemente ya se ha difundido y permanecido en hatos lecheros mexicanos. Desafortunadamente al no conocerse del todo el ciclo de vida del parásito, no se pueden establecer medidas de control y prevención directas, sin embargo deben practicarse al menos las medidas generales de bioseguridad propuestas por algunos autores (96). Este trabajo inicial de investigación dará pauta para que se sigan realizando investigaciones epidemiológicas de la Neosporosis bovina en México.

LITERATURA CITADA:

- 1.-Barr, B. C., Conrad, P. A., Dubey, J. P., Anderson, M. L.: *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: Pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J. Vet. Diag. Invest.*, 3: 39-46 (1991).
- 2.-Bjerkas, I., and Presthus, J.: Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand.*, 96: 445-454 (1988).
- 3.-Cole, R. A., Lindsay, D. S., Dubey, J. P., Toivio-Kinnucan, M. A., Blagburn, B. L.: Characterization of a murine monoclonal antibody generated against *Neospora caninum* tachyzoites by use of western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Am. j. vet. Res.*, 55: 1717-1723 (1994).
- 4.-Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J. and Uggla, A.: Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. vet. med. Ass.*, 192:1269-1285 (1988).
- 5.-Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.; Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. vet. Res.*, 50: 1981-1983 (1989).
- 6.-Lindsay, D. S., Speer, C. A and Toivio-Kinnucan, M. A.: Use of infected culture cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. *Am. J. vet Res.*, 54: 103-106 (1993).
- 7.-Bjerkas, I., Mohn, S. F. and Presthus, J.: Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitk.*, 70: 271-274 (1984).
- 8.-Dubey, J. P.: *Neospora caninum*: A look at a new *Toxoplasma*-like parasite of dogs and other animals. *Comp. Cont. Educat. Pract. Vet.*, 12: 653-663 (1990).
- 9.-Dubey, J. P.: A review of *Neospora caninum* and *Neospora*- like infections in animals. *J. of Protozool. Res.*, 2: 40-52 (1992).
- 10.-Barber, J. S. and Trees, A. J.: Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *Vet Rec.*, 139: 439-443 (1996).
- 11.-Anderson, M. L., Barr, B. C., Conrad, P. A., Thurmond, M., Picanso, J. and Dubey, J. P.: Bovine Protozoal Abortions in California.: *Bovine Pract.*, 2: 102-104 (1991).
- 12.-Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C., Dubey, J. P., Hoffman, R. L. and Conrad, P. A.: *Neospora* like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. vet. med. Ass.*, 198: 241-244 (1991).
- 13.-Barr, B. C., Anderson, M. L. and Blanchard, P. C.: Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infection. *Vet. Pathol.*, 27: 354-361 (1990).

- 14.-Barr, B. C., Anderson, M. L., Dubey, J. P., Conrad, P. A.: *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.*, **28**: 110-116 (1991).
- 15.-Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C. and Hoffman, R. L.: A survey of causes of bovine abortion occurring in the San Joaquin Valley, California. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**: 283-287 (1990).
- 16.-Nietfeld, J. C., Dubey, J. P., and Anderson, M. L.: *Neospora*-like protozoan infection as a cause of abortion in dairy cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**: 223-226 (1992).
- 17.-Dubey, J. P., Janovitz, E.B. and skowronek, A.J.: Clinical neosporosis in a 4 week old Hereford calf. *Vet. Parasitol.*, **43**: 137-141 (1992).
- 18.-Hoar, R. B., Ribble, S. C., Spitzer, C. C., Spitzer, P. G., Janzen, E. D.: Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with *Neospora sp.* infection. *Can. Vet. J.*, **37**: 364-366 (1996).
- 19.-Dubey, J. P. and Lindsay, D. S.: A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, **67**: 1-59 (1996).
- 20.-Dubey, J. P. and Lindsay, D. S.: *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**: 230-233 (1990).
- 21.-Dubey, J. P., Hartley, W. J., Lindsay, D. S. and Topper, M. J.: Fatal congenital *Neospora caninum* infection in a lamb. *J. Parasitol.*, **76**: 127-130 (1990).
- 22.-Barr, B. C., Anderson, M.L., Woods, L. W., Dubey, J.P. and Conrad, P. A.: *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**: 365-367 (1992).
- 23.-Dubey, J. P., Morales, J. A., Villalobos, P., Lindsay, D. S., Blagburn, B. L. and Topper, M. J.: Neosporosis-associated abortion in a dairy goat. *J. Am. vet. med. Ass.*, **208**: 263-265 (1996).
- 24.-Dubey, J. P. and Portefield, M. L.: *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J. Parasitol.*, **76**: 732-734 (1990).
- 25.-Gray, M. L., Harmon, B. G., Sales, L. and Dubey, J. P.: Visceral neosporosis in a 10 year-old horse. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**: 130-133 (1996).
- 26.-Marsh, A. E., Barr, B.C., Madigan, J., Lakritz, J., Nordhausen, R., Conrad, P. A.: Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *J. Am. vet. med. Ass.*, **209**: 1907-1908 (1996).
- 27.-Woods, L. W., Anderson, M. L., Swift, P. K. And Sverlow, K. W.: Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**: 508-510 (1994).

- 28.-Dubey, J. P., Rigoulet, J., Lagourette, P., George, C., Longeart, L. and LeNet, J. L.: Fatal Transplacental neosporosis in a deer (*cervus eldi siamensis*). *J. Vet. Diag. Invest.*, **82**: 338-339 (1996).
- 29.-Barr, B. C., Conrad, P. A., Sverlow, K. W., Tarantal, A. F. and Hendrick, A. G.: Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab. Invest.*; **71**: 236-242 (1994).
- 30.-Dubey, J. P., Lindsay, D. S. and Lipscomb, T. P.: Neosporosis in cats. *Vet. Pathol.*; **27**:335-339 (1990).
- 31.-Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.: *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa).infections in rats. *Can. J. Zool.*; **68**: 1595-1599 (1990)
- 32.-Dubey, J. P., Hattel, A. L., Lindsay, D. S. and Topper, M. J.: Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs. Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. vet. med. Ass.*, **193**:1259-1263 (1988).
- 33.-Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.: Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J. Parasitol.* **76**: 410-413 (1990).
- 34.-Lindsay, D. S., Dubey, J. P. and Blagburn, B. L.: Characterization of a *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) isolate (NC-3) in mice. *J. Alabama Acad. Sci.*; **62**: 1-8 (1991).
- 35.-Lindsay, D. S., Blagburn, B. L. and Dubey, J. P.. Infection of mice with *Neospora caninum* (protozoa: Apicomplexa) does not protect against challenge with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.*; **58**:2699-2700 (1990).
- 36.-Cuddon, P., Lin, D. S., Bowman, D. D., Lindsay, D. S., Miller, T. K., Duncan, I. D., deLahunta, A., Cummings, J., Suter, M., Cooper, B., King, J. M. and Dubey, J. P.: *Neospora caninum* infection in English Springer Spaniel littermates: Diagnostic evaluation and organism isolation. *J. Vet. Inter. Med.*, **6**: 325-332 (1992).
- 37.-Thilsted, J. P. and Dubey, J. P.: Neosporosis-Like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diag. Invest.*, **1**: 205-209 (1989).
- 38.-Conrad, P. A., Anderson, M. L. and Barr, B. C.: *Neosporosis*: A newly recognized cause of abortion in dairy cattle. 2nd. Western Large Herd Dairy Management Conference. Las Vegas. NV.. April 6-8, 1995.
- 39.-Bjerkas, I. and Presthus, J.: The neurophatology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cys-forming sporozoon in dogs. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand.*, **97**: 459-468 (1989).
- 40.-Bjerkas, I. and Dubey, J P.: Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. *Acta. Vet. Scand.*, **32**: 407-410 (1991) .

- 41.-Bjerkas, I., and Presthus, J.: Immuno-histochemical and ultrastructural characteristics of a cyst-forming sporozoon associated with encephalomyelitis and myositis in dogs. *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand.*, **96**: 445-454 (1988).
- 42.-Dubey, J. P.: *Neospora caninum*: A look at a new Toxoplasma-like parasite of dogs and other animals. *The Compendium Small Animal*. **12**: 653-663 (1990).
- 43.-Ruehlmann, D., Podell, M., Oglesbee, M and Dubey, J. P.: Canine Neosporosis: A case report and literature review. *J. Am. anim. hosp. Ass.* **31**: 174-182 (1995).
- 44.-Dubey, J. P., Miller, S., Lindsay, D. S. and Topper, M. J.: *Neospora caninum* associated myocarditis and encephalitis in an aborted calf. *J. Vet. Diag. Inves.*, **2**: 66-69 (1990).
- 45.-Conrad, P. A., Barr, B. C. and Sverlow K.W: In vitro isolation and characterization of *Neospora sp.* from aborted bovine fetuses. *Parasitol.* **106**: 239 -249 (1993).
- 46.- Barr, B. C., Rowe, J. D., Sverlow, K. W., BonDurant, R. H., Ardans, A. A., Oliver, M. N. and Conrad, P. A. : Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6** :207-215 (1994)
- 47.-Anderson, M. L., Palmer, Ch. W., Thurmond, M. C., Picanso, J. P., Blanchard. P. T., Breitmeyer, R. E., Layton, A. W., mcAllister, M., Daft, B., Kinde, H., Read, D. H., Dubey, J. P., Conrad, P. A. and Barr, B. C.: Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. med. vet. Ass.*, **207**: 1206-1210 (1995).
- 48.-Wouda, W., Moen, A. R., De Gee, A. L. and Knapen, F. V. : Laboratory and field experiences with bovine *Neospora* abortion in Dutch dairy herds. Proceedings of the 41st. Annual Meeting of the American Association of Veterinary Parasitologists. Louisville, KY., U.S.A. 1996. Pag. 21. *Annual Meeting of the American Association of Veterinary Parasitologists*. Louisville. KY., U.S.A. (1996).
- 49.-Thornton, R. N., Thompson, E. J. and Dubey, J. P.: *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *New Zealand Vet. J.*, **39**: 129-133 (1991).
- 50.-Otter, A., Griffiths, I. B. and Jeffrey, M.: Bovine *Neospora caninum* abortion in the U. K. (letter). *Vet. Rec.*: **133**: 375 (1993).
- 51.-Trees, A. J., Guy, F., Low, J. C., Roberts, L., Buxton, D. and Dubey, J.P.: Serological evidence implicating *Neospora* species as a cause of abortion in British cattle. *Vet. Rec.* **134**: 405-407 (1994).
- 52.-Poncelet, L., Bjerkas, Y., Charlier, G. Coignoul, F., Losson, B. and Balligand. Confirmation de la presence de *Neospora caninum* en Belgique. *Ann. Med. Vet.*, **134**: 501-503 (1990).
- 53.-Oberdorf, D. and Mason R.: *Neospora caninum* infection detected in a bovine aborted foetus. *Aust. Sac. Vet. Path. Report.*, **28**: 36 -37 (1990).

- 54.-Ogino, H., Watanabe, E. and Watanabe, S.: Neosporosis in the aborted fetus and newborn calf *J. Comp. Path.*, **107**: 231-237 (1992).
- 55.-Jardine, J. E. and Last R. D.: *Neospora caninum* in aborted twin calves. *J. South Africa . Vet. ssoc.*, **64**:101 (1993).
- 56.-Harmelin, A., perl, A., Nyska, A., Yakobson, B., Shpigelfi, N., Orgard, U. and Dubey, J. P. Neosporosis associated bovine abortion in Israel. *Vet. Rec.*, **136** :80 (1995).
- 57.-Colley, P. M. : *Neospora abortion* in cattle in Ireland. *Vet. Rec.*, **136** : 595 (1995).
- 58.-Holmdahl, O. J. M., Bjorkman, C. and Uggla, A. : A case of *Neospora* associated bovine abortion in Sweden. *Acta. Vet. Scand.*, **36** : 279-281 (1995).
- 59.-Blidfell, R., Davidson, J. and Dubey, J. P.: *Neospora* induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. *Can. Vet. J.*, **35**: 122 (1994).
- 60.-Bryan, L. A., Gajadhar, A.A., Dubey, J. P. and Haines, D.M.: Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora sp.* protozoan. *Can. Vet. J.* **35**: 111-113 (1994).
- 61.-McIntosh, W. D. and Haines, M. D.: *Neospora* infection in an aborted fetus in British Columbia. *Can. Vet. J.*, **35**: 114-115 (1994).
- 62.-Venturini, L., Di Lorenzo, C., Venturini, C. y Romero, J. : Anticuerpos anti *Neospora sp.* en vacas que abortan. *Vet. Arg.*, **12** : 167-170 (1995).
- 63.-Barr, B. C., Conrad, P. A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M. L., Reynolds, J., Chauvert, A.E.A., Dubey, J. P. and Ardans, A. A.: Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora* - infected fetuses: Four cases (1990-1992). *J. Am. vet. med. Ass.*, **202**: 113-117 (1993).
- 64.- Anderson, M. L., Reynolds, J. P., Rowe, J. D., Sverlow, K. W., Packham, A. E., Bradd, B. C and Conrad, P.A. : Evidence of vertical transmission of *Neospora sp.* infection in dairy cattle *J. Am. vet. med. Ass.*, **210**: 1169-1172 (1997).
- 65.- Paré, J., Thurmond, M. C. and Hietala, S. K.: Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can. Vet. Res.*, **60**: 133-139 (1996)
- 66.-Dubey, J. P. and Lindsay, D. S.: Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **50**: 1578-1579 (1989).
- 67.-Dubey, J. P. and Lindsay, D. S.: Transplacental *Neospora caninum* infection in cats.. *J. Parasitol.*, **75**: 765-771 (1989).

- 68.-Dubey, J. P. and Lindsay, D. S.: *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**: 230-233 (1990).
- 69.-Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Anderson, M. L., Davis, S. W. And Shen, S. K.: Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *J. Am. vet. med. Ass.*, **201**: 709-713 (1992).
- 70.-Cole, R. A., Lindsay, D. S., Blagburn, B. L. and Dubey, J. P.: Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J. Parasitol.*, **81**: 730-732 (1995).
- 71.-Jardine, J. E.: The ultrastructure of bradizoites 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 (1996).
- 72.- Lindsay, D. S., Dubey, J. P. and Cole, R. A.: *Neospora*-Induced protozoal abortions in cattle. *Comp. Cont. Educat. Pract. Vet.*, **15**: 882-889 (1993).
- 73.-Dubey, J. P., Lindsay, D. S.: Neosporosis. *Parasitol. Today.*, **9**: 452-457 (1993).
- 74.-Speer, C. A. and Dubey, J. P.: Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J. protozool.*, **36**: 458-463 (1989).
- 75.-Marsh, A. E., Barr, B. C., Sverlow, K. Ho. M., Dubey, J. P. and Conrad, P. A.: Sequence analysis and comparison of ribosomal DNA from bovine *Neospora* to similar coccidial parasites. *J. Parasitol.*, **81**: 530-535 (1995).
- 76.- Guo, Z. G. and Johnson, A. M.: Genetic comparison of *Neospora caninum* with *Toxoplasma* and *Sarcocystis* by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Parasitol. Res.*, **81**: 365-370 (1995).
- 77.-Yamaga, M., Flechtner, O. and Gottstein, B.: *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.*, **82**: 272-279 (1996).
- 78.-O'Toole, J. M., and Jeffrey, M.: Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. *Vet. Rec.*, **121**: 563-566 (1987).
- 79.-Dubey, J. P.: Congenital neosporosis in a calf. *Vet. Rec.*, **125**: 486 (1989).
- 80.-Dubey, J. P., Abbit, B., Topper, M. J. And Edwards, J. F.: Hydrocephalus associated with *Neospora caninum* infection in an aborted bovine fetus. *J. Comp. Path.*, **118**: 171-173 (1988).
- 81.-Yamane, I., Kokuho, T., Shimura, K., Esto, M., Haritani, M., Ouchi, Y., Sverlow, K. W. and Conrad, P. A.: In vitro isolation of bovine *Neospora* in Japan. *Vet. Rec.*, **138**: 652 (1996).

- 82.- Stenlund, S., Bjorkman, C., Holmdahl, O. J. M., Kindahl, H. and Uggla, A.: Characterization of a swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.*, **83**: 214-219 (1997).
- 83.-Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.: In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa, Apicomplexa) from dogs. *J. Parasitol.*, **75**: 163-165 (1989).
- 84.-Dubey, J. P., Hartley, W. J., and Lindsay, D. S.. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *J. Am. vet. med. Ass.*, **197**: 1043-1044 (1990).
- 85.-Dubey, J. P., Leathers, C. W. and Lindsay, D. S.: *Neospora caninum*-like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. *J. Parasitol.*, **75**: 146-148 (1989).
- 86.-Parish, S. M., Maag-miller, L., Basser, T. E., Weidner, J. P., McElwain, T., Knowles, D. P. and Leathers, C. W.: Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves. *J. Am. vet. med. Ass.*, **191**: 1599-1600 (1987).
- 87.-Shivaprasad, H. L., Ely, R. and Dubey, J. P.: A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet. Parasitol.*, **34**: 145-148 (1989).
- 88.-Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Adams, D. S., Gy, J. M., Bszler, T. V., Blagburn, B. L. and Thulliez, P.: Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*.. *Am. J. Vet. Res.*, **57**: 329-336 (1996).
- 89.-Anderson, M. L., Barr, C. B., Blanchard, C. P., Dubey, J. P. and Conrad, P. A.: Immunohistochemical diagnosis of protozoal abortion in cattle. *American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians: Abstracts 33rd. Annual Meeting, Denver, Colorado, october 7-9, 1990.* 1990, 19; 3 ref. Madison, Wisconsin, USA: AAVLD.
- 90.-Wouda, W., Moen, A. R., Visser, I. J. R. and van Knapen, F.: Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**: 180-185 (1997).
- 91.-Cole, R. A., Lindsay, D. S., and Dubey, J. P.: Detection of *Neospora caninum* in tissue sections using murine monoclonal antibody. *J. Vet. Diag. Inv.*, **5**: 579-584 (1993).
- 92.-Barr, B. C., Anderson, M. L., Sverlow, K. W. and Conrad, P. A.: Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.*, **137**: 611-613 (1995).
- 93.-Graham, D. A., Smyth, J. A., McLaren, I. E. and Ellis, W. A.: Stillbirth/perinatal calf syndrome: serological examination for evidence of *Neospora caninum* infection. *Vet. Rec.*, **139**: 523-524 (1996).
- 94.-Reichel, M. P. and Drake, J. M.: The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. *New Zealand Vet. J.*, **44**: 151-154 (1996).

- 95.-Paré J., Hietala, S. K., Thurmond, M. C.: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**:352-359 (1995).
- 96.-Thurmond, M. C. and Hietala, S. K.: Strategies to control *Neospora* infection in cattle. *Bovine Practitioner*, **29**: 60-63 (1995).
- 97.-Thurmond, M. C. and Hietala, S. K.: Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, **57**: 1559-1562 (1996).
- 98.-Choromanski, L., Shibley, G. y Simonson, R.: Caracterización inmunológica de diferentes formulaciones experimentales de la vacuna contra *Neospora caninum*. Memorias del XXII Congreso Nacional de Buiatría. Acapulco Guerrero, México. 1998. Pag. 543-546. *XXII Congreso Nacional de Buiatría*. Acapulco Guerrero, México. (1998).
- 99.-Hay, W. H., Shell, L. G., Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.: Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *J. Am. vet. med. Ass.*, **197**: 87-89 (1990).
- 100.-Lindsay, D. S., and Dubey, J. P.: Evaluation of anticoccidial drugs to inhibit development of *Neospora caninum* in cell cultures. *J. Parasitol.*, **75**: 990-992 (1989).
- 101.-Lindsay, D. S. and Dubey, J. P.: Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *J. Parasitol.*, **76**: 177-179 (1990).
- 102.-Mayhew, Y. G., Smith, K. C., Dubey, J. P., Gatwald, L. K. and McGlennon, N. J.: Treatment of encephalomyelitis due to *Neospora caninum* in a litter of puppies. *J. Small Anim. Pract* **32**: 609-612 (1991).
- 103.-Hietala, S. K.: Control e implicaciones económicas del aborto infeccioso en ganado. Memorias del Seminario Anual Elanco de Ganado de Leche. México, D.F. 1998. Pag. 1-5. *Seminario Anual Elanco de Ganado de Leche*. México, D.F. (1998).
- 104.-Thurmond, M. C. and Hietala, S. K.: Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows; *J. Am. vet. med. Ass.*, **210**: 672-674 (1997).
- 105.-Abbitt, B., Craig, T. M., Jones, L. P., Huey R. L., Eugster, A. K. Protozoal abortion in a herd of cattle concurrently infected with *Hammondia pardalis*. *J. Am. vet. med. Ass.*, **20**: 444-448 (1993).
- 106.-Delgado, G. R., Quintero, C. J. y Luna, De A. A.: Estudio Patológico, Microbiológico y Serológico del Aborto en Bovinos Holstein de la Comarca Lagunera. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría. Torreón Coahuila, México. 1995. Pag. 74-78. *XIX Congreso Nacional de Buiatría*, Torreón Coahuila, México, (1995).
- 107.-Morales, S. E., Ramírez, L. J., Trigo, T. F., Ibarra, V. F., Puente C. E. y Santa Cruz, M.: Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora* sp en México. *Vet Méx.*, **28**: 353-357 (1997)

- 108.-Valero, E. G.: Diagnóstico Veterinario. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C. *Fac. De Med. Vet. Y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 1993
- 109.-Bland M.: An introduction to medical statistics. 2nd de. *Oxford University Press Inc.* New York, 1995.
- 110.-Barber, J. S., Holmdahl, O. J. M., Owen, M. R., Guy, F. and Uggla, A.: Characterization of the first European isolate of *Neospora caninum* (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). *Parasitology*. 111: 563-568 (1995).
- 111.-Helman, R. G., Stair, E. L., Lehenbauer, T. W., Rodgers, S. and Saliki, J. T.: Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses *J. Vet. Diagn. Invest.*, 10: 292-295 (1998).
- 112.-Haines, D. M. and Chelack, B. J.: Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 3: 101-112 (1991).
- 113.-Paré, J., Thurmond, M. C. and Hietala, S. K.: Epidemiology of *Neospora caninum* in endemically infected California dairy herds. Proceedings of the 41st. Annual Meeting of the American Association of Veterinary Parasitologists. Louisville. KY., U.S.A. 1996. Pag. 22. *Annual Meeting of the American Association of Veterinary Parasitologists*. Louisville. KY., U.S.A. (1996).
- 114.-Thurmond, M. C., Hietala, S. K., Blanchard, P. and DeBey, S.: Congenital transmission of *Neospora caninum* in herds experiencing endemic or epidemic abortion. Proceedings of the 38th American Meeting Association of Veterinary Laboratory Diagnostician. Sparks, Nevada. U.S.A. 1995. Pag. 97. *American Meeting Association of Veterinary Laboratory Diagnostician*. Sparks, Nevada, U.S.A. (1995).
- 115.-Lindsay, D. S., Blagburn, B. L. and Dubey, J. P.: Factors affecting the survival of *Neospora caninum* bradyzoites in murine tissues. *J. Parasitol*; 78: 70-72 (1992).
- 116.- Obendorf, D.L., Murray, N., Veldhuis, G., Munday, B. L. and Dubey, J. P.: Abortion caused by neosporosis in cattle. *Aust. Vet. J.* 72: 117-118 (1995).

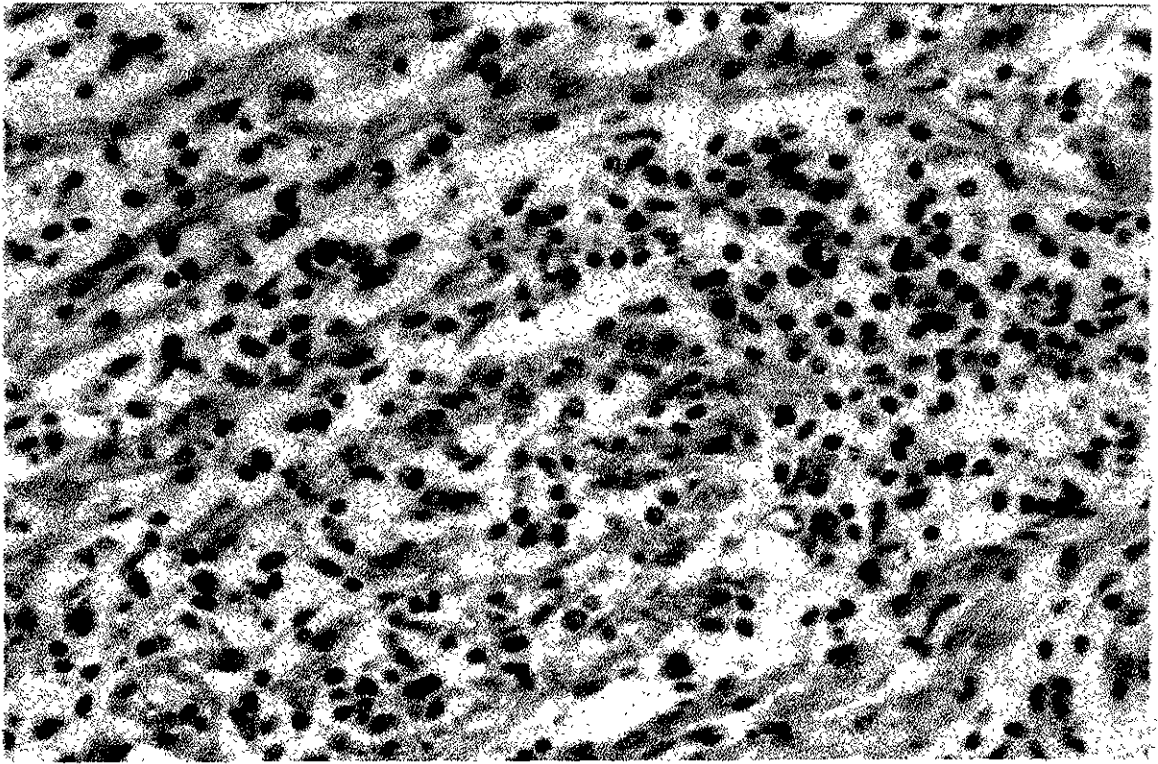


Figura 1. Microfotografía de miocardio en la que se aprecian abundantes células inflamatorias mononucleares en las fibras musculares (miocarditis no supurativa severa). 400 X, H.E.

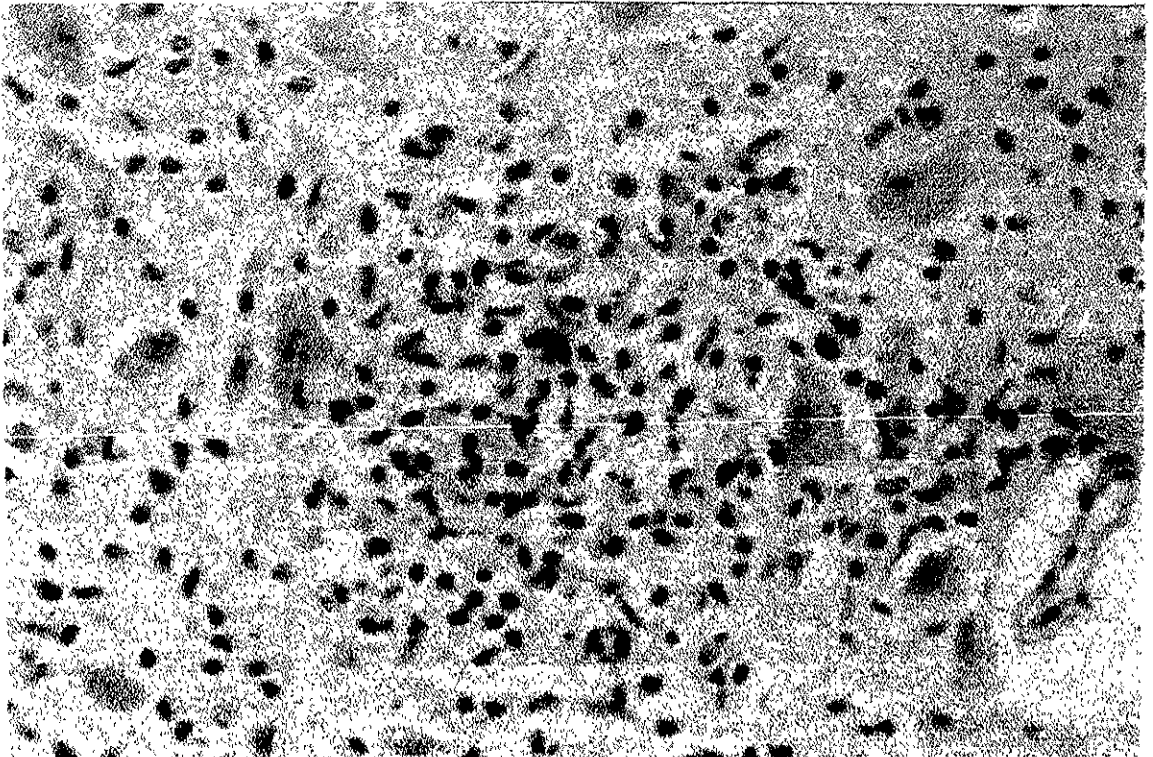


Figura 2. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia agregación de abundantes células gliales (Gliosis). 400 X, H.E.

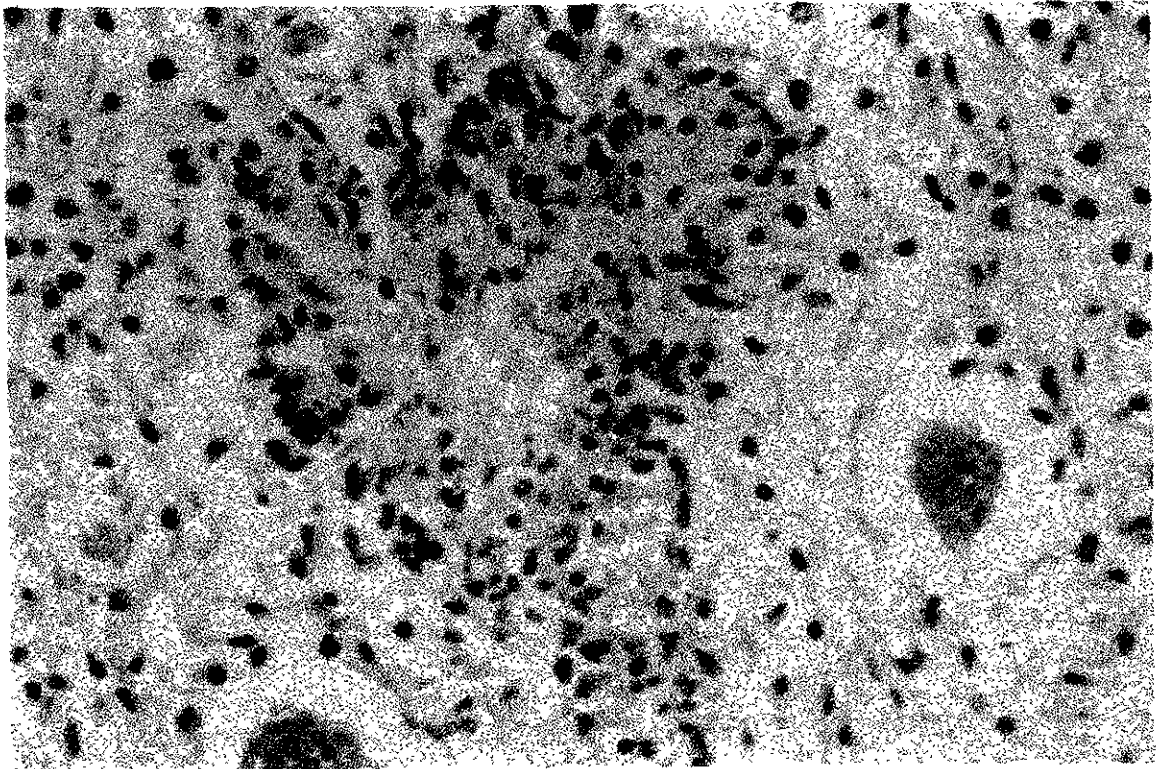


Figura 3. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia un foco de necrosis, rodeado por abundantes células inflamatorias mononucleares. 400 X. H.E.

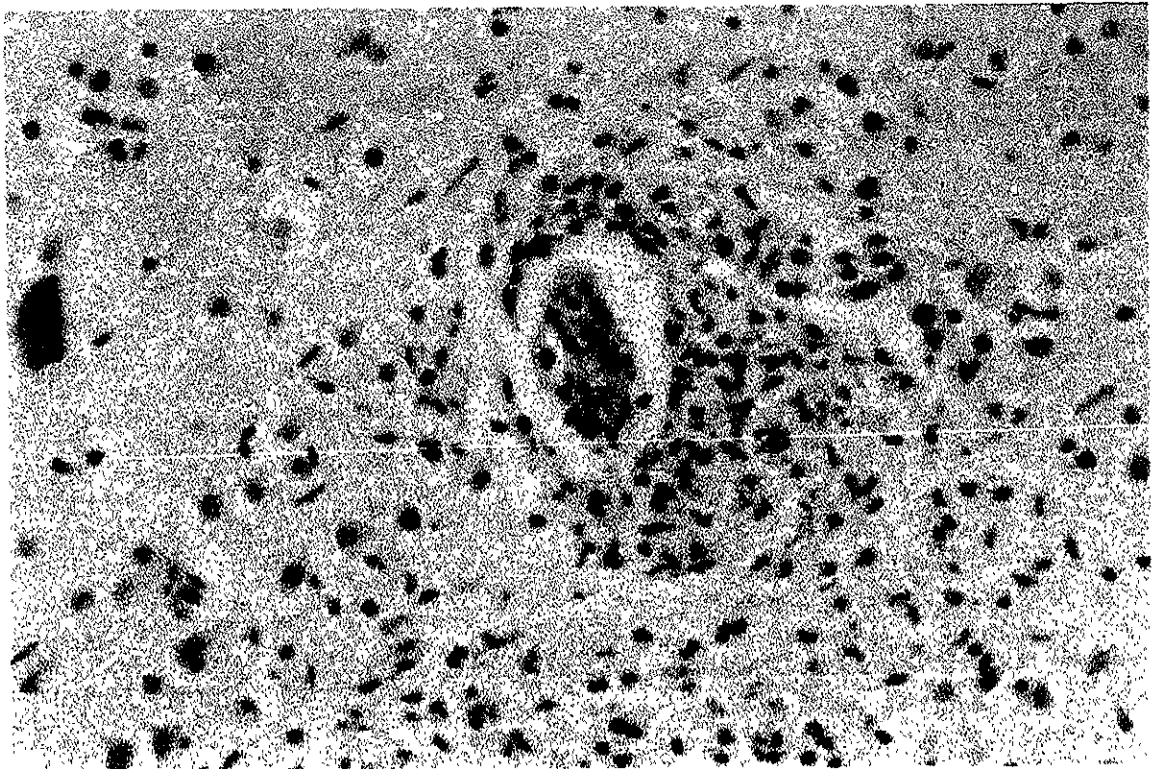


Figura 4. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia agregación de células gliales y linfocitos alrededor de un vaso sanguíneo. 400 X. H.E.

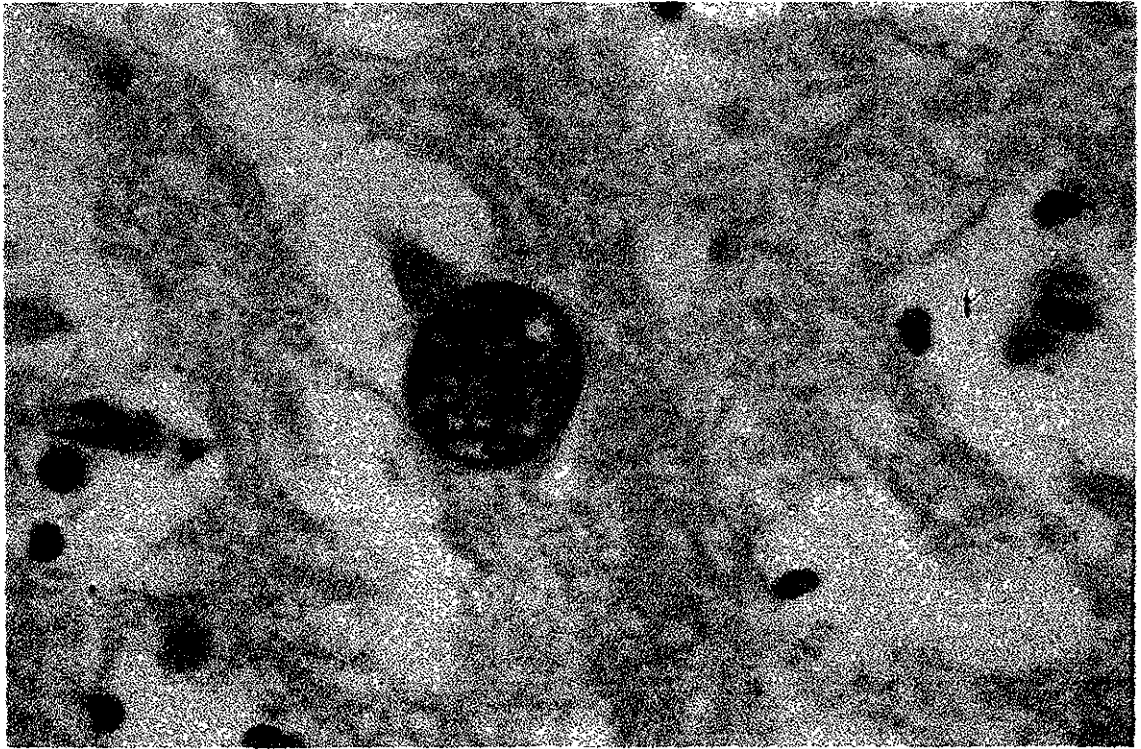


Figura 5. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia un quiste parasitario correspondiente a *Neospora caninum*. Nótese la ausencia de reacción inflamatoria. 1000 X. P.A.S.

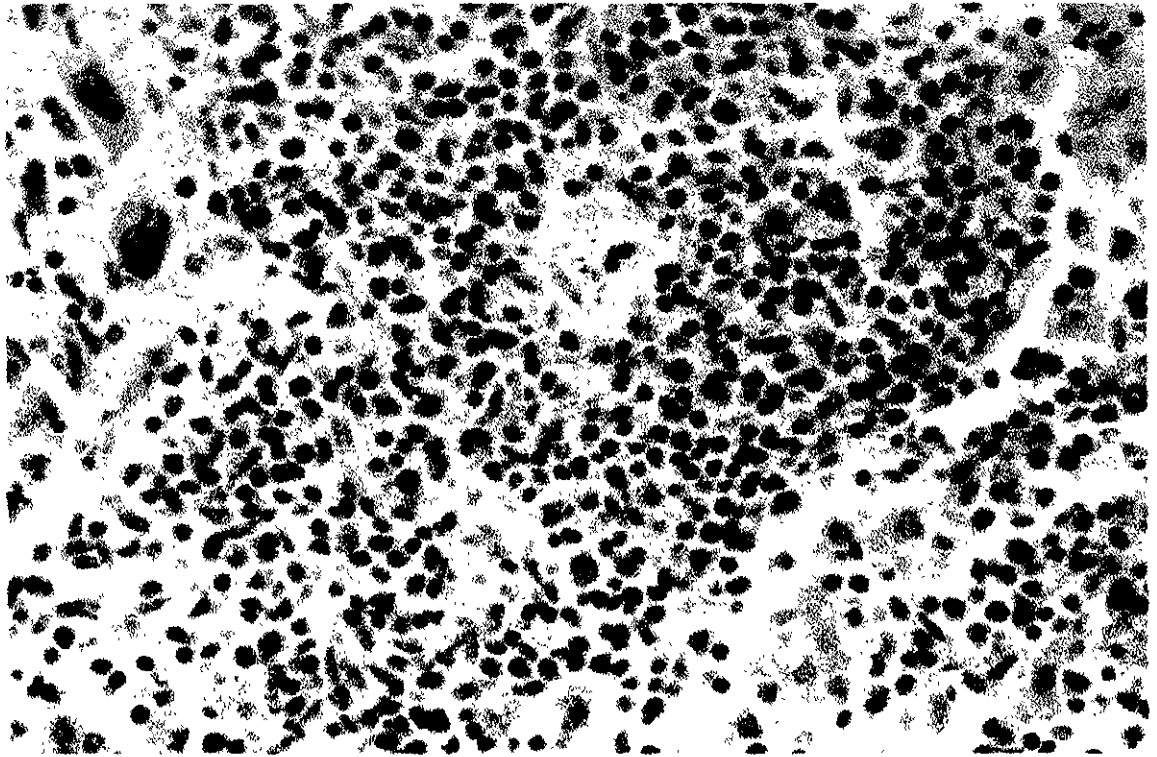
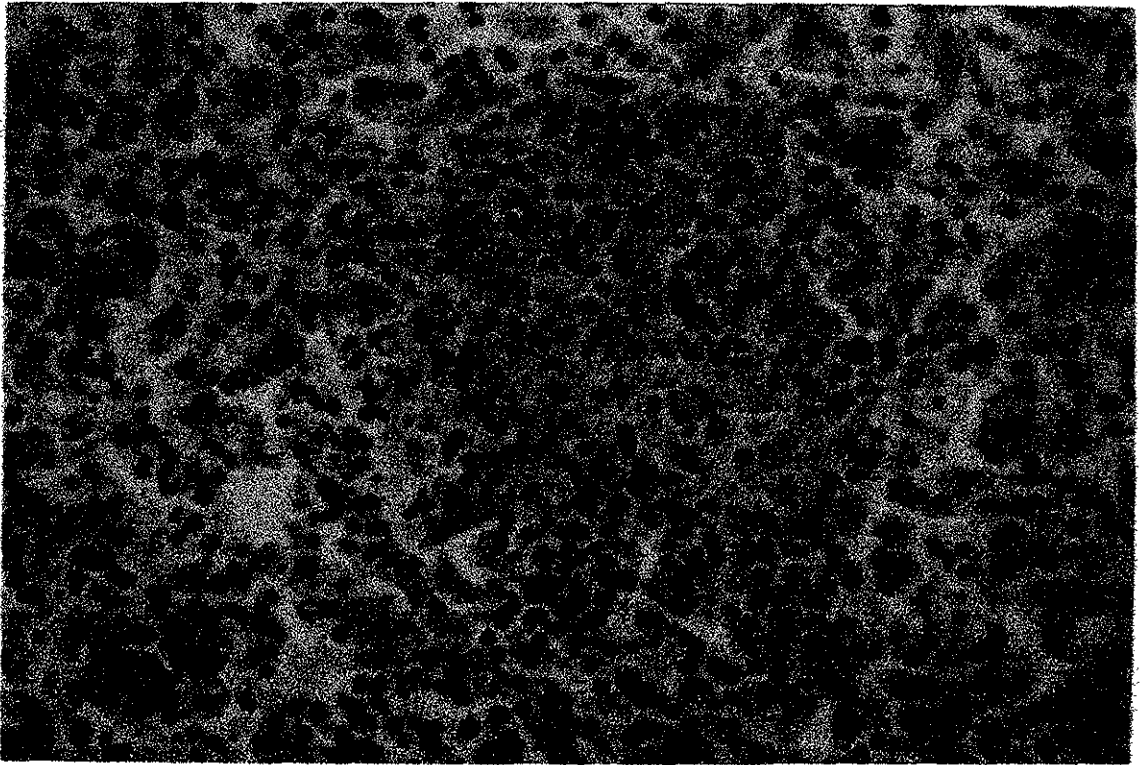
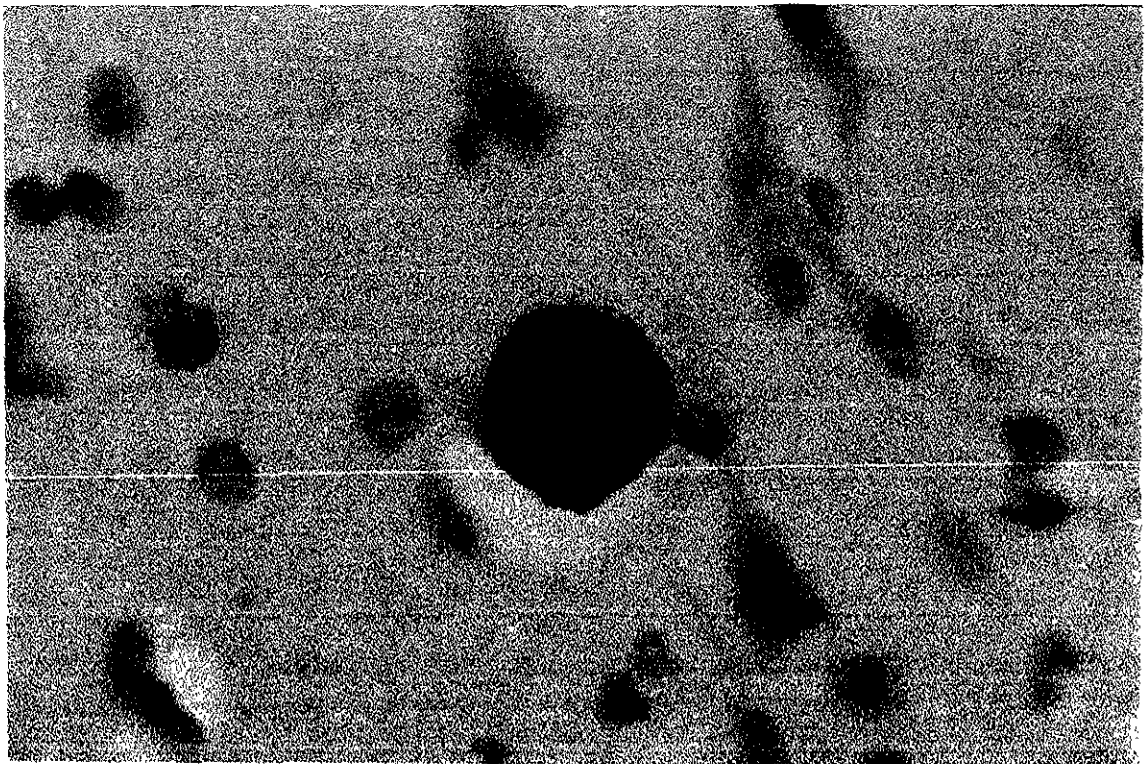


Figura 6. Microfotografía de hígado en la que se aprecian abundantes células inflamatorias mononucleares pequeñas con distribución periportal. 400 X. H. E.

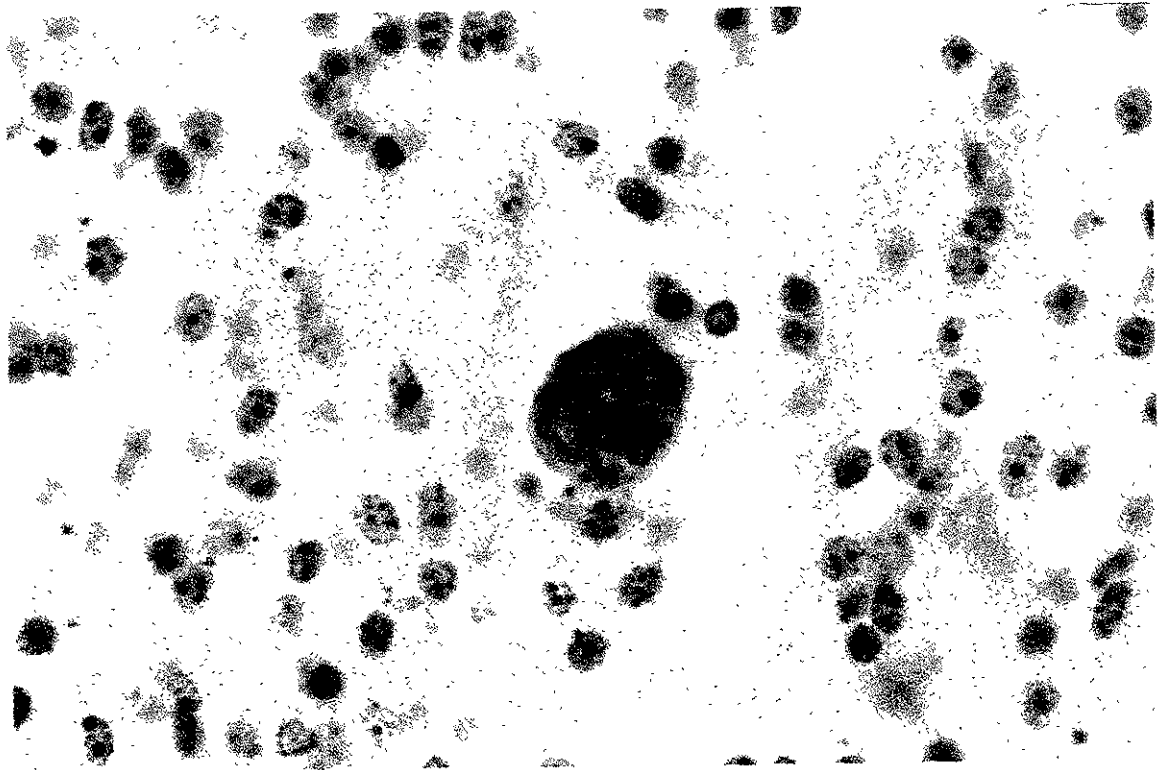
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



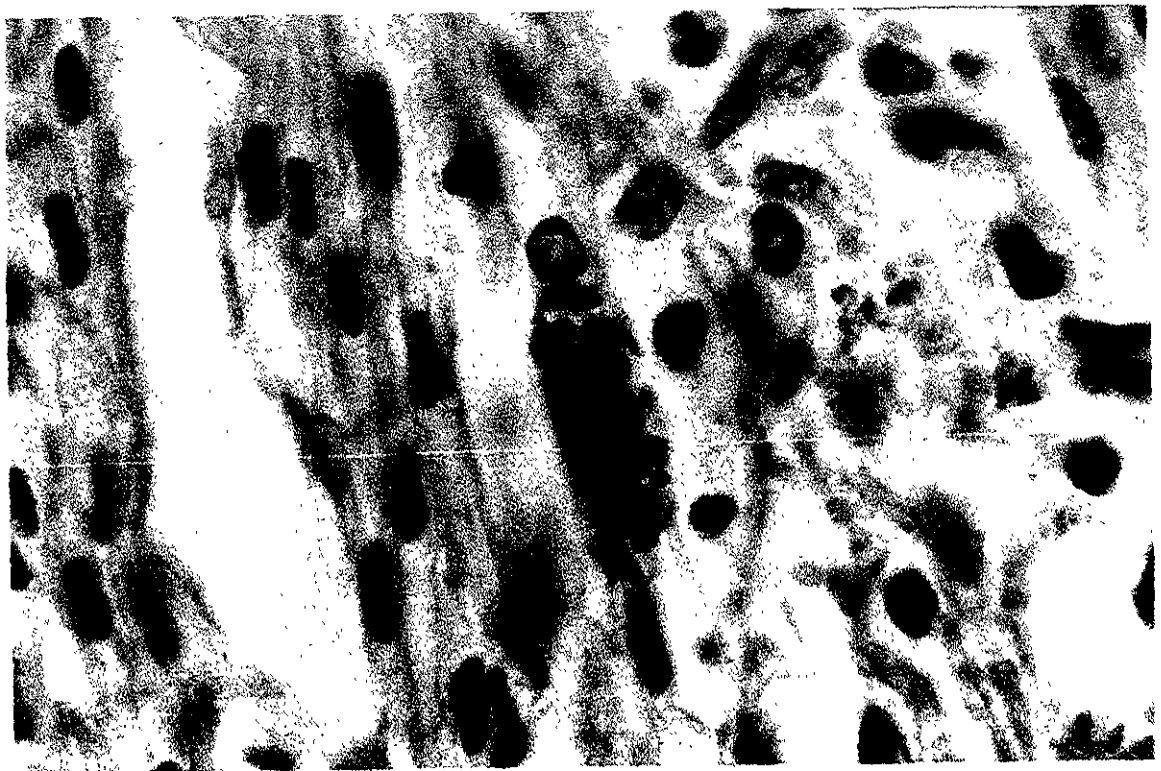
**Figura 7. Microfotografía de hígado en la cual se aprecia un foco de necrosis.
400 X. H. E.**



**Figura 8. Microfotografía de cerebro en la que se aprecia un quiste parasitario correspondiente a
Neospora caninum. Nótese que se tiñe por completo de color café ocre. 1000 X. I.P.**



**Figura 9. Microfotografía de cerebro en la cual se aprecia un grupo de taquizoitos.
1000 X. I.P.**



**Figura 10. Microfotografía de miocardio en la que se aprecian taquizoitos
dentro de las fibras musculares. 1000 X. I.P.**

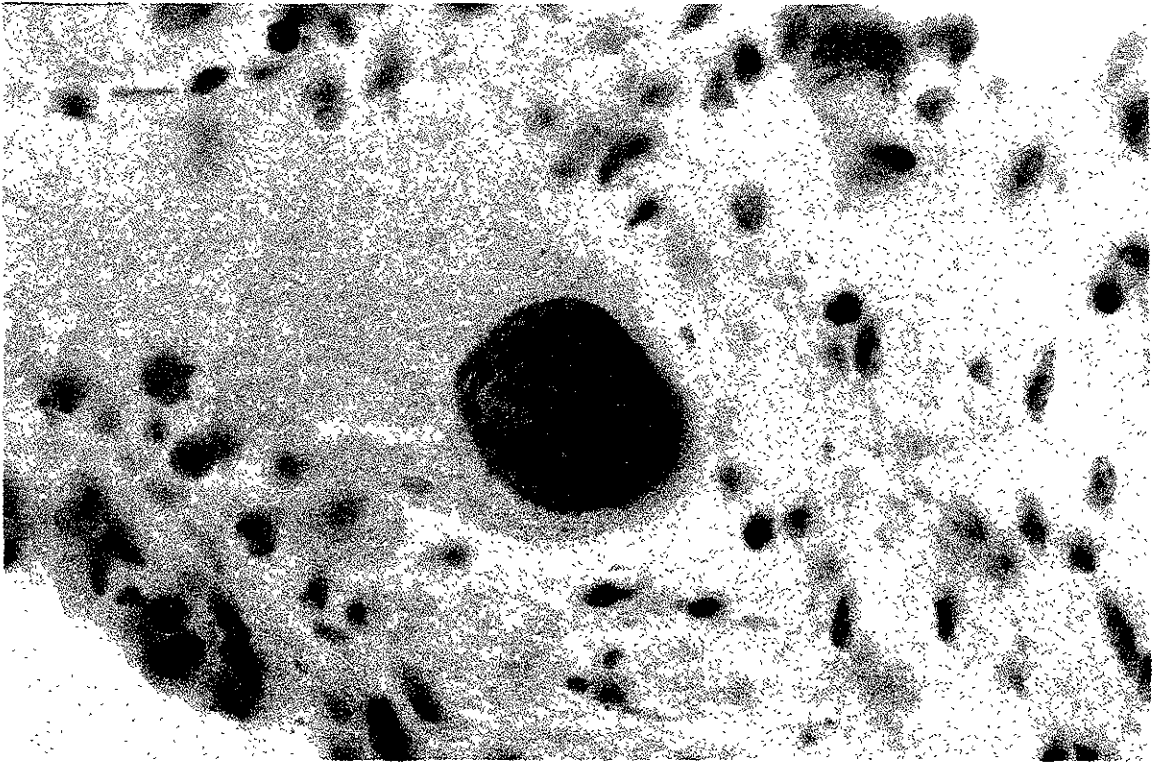


Figura 11. Microfotografía de miocardio en la que se aprecia un quiste parasitario dentro de una célula nerviosa. 1000 X. I.P.

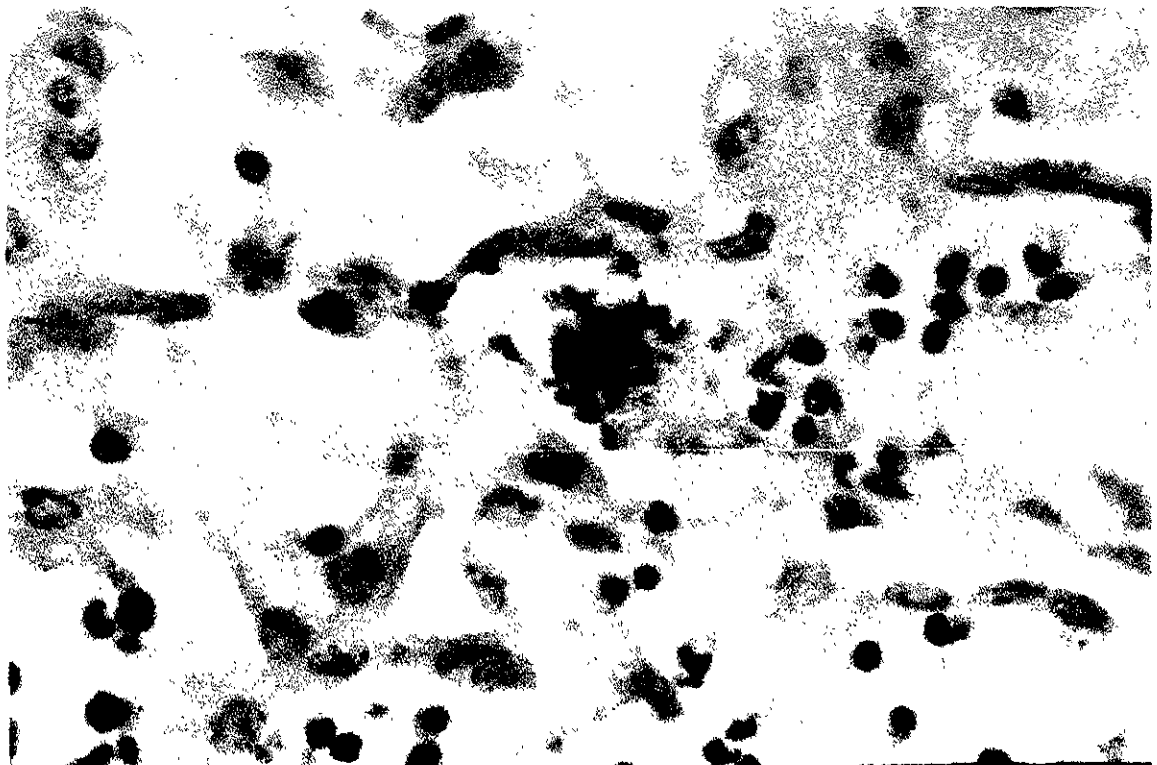


Figura 12. Microfotografía de hígado en la que se aprecia un grupo de taquizoitos. 1000 X. I.P.

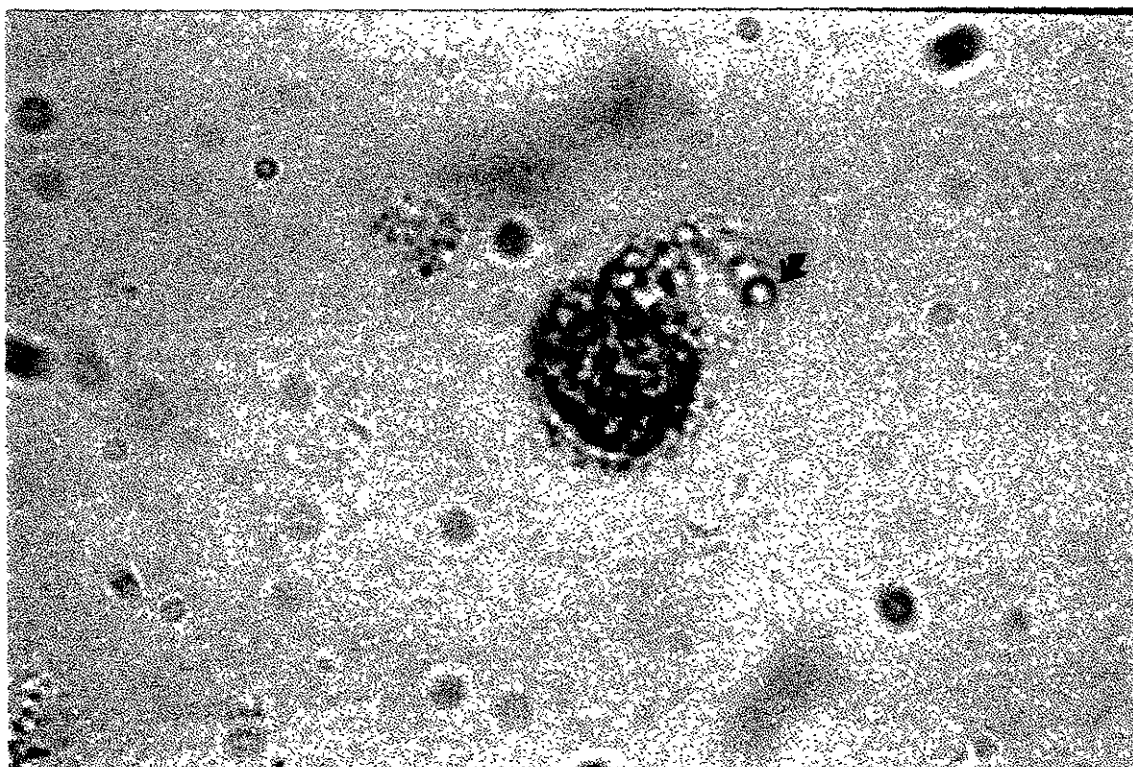


Figura 13. Microfotografía de una célula en cultivo (Vero) en la cual se aprecia la salida de parásitos a través de ella (Flecha). 400 X

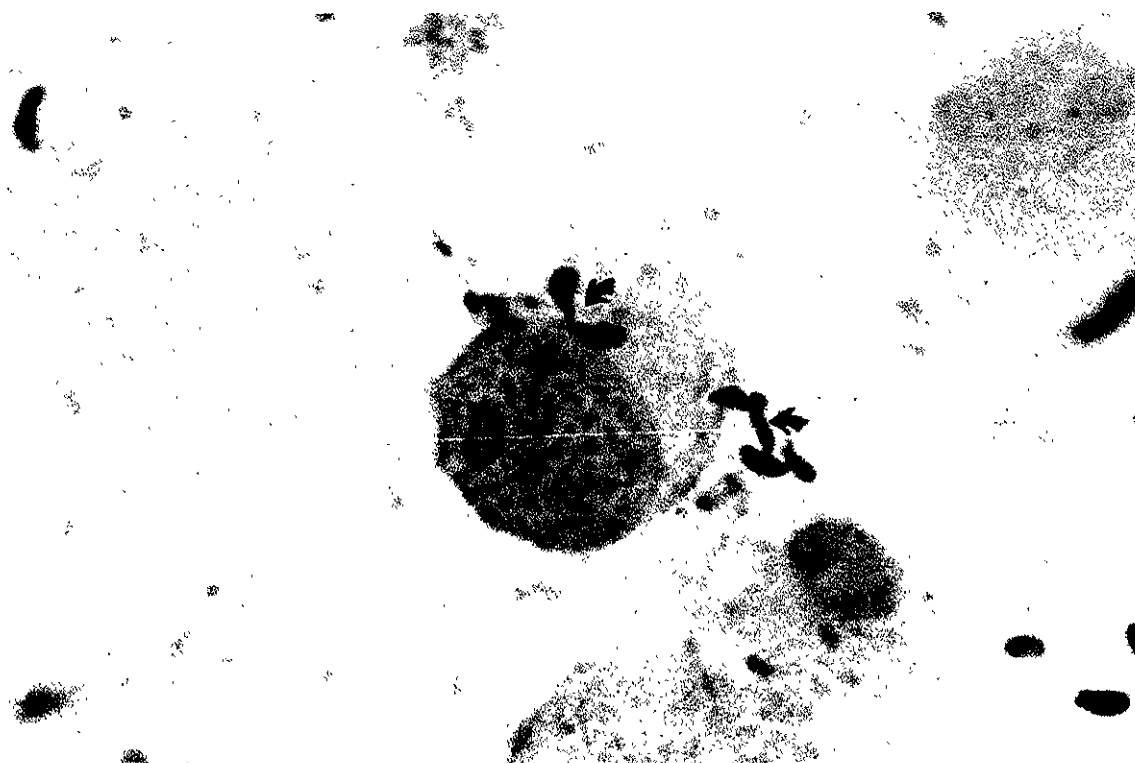


Figura 14. Microfotografía en la que se aprecian taquizoitos dentro y fuera de las células de cultivo (Flechas). 1000 X. I.P.

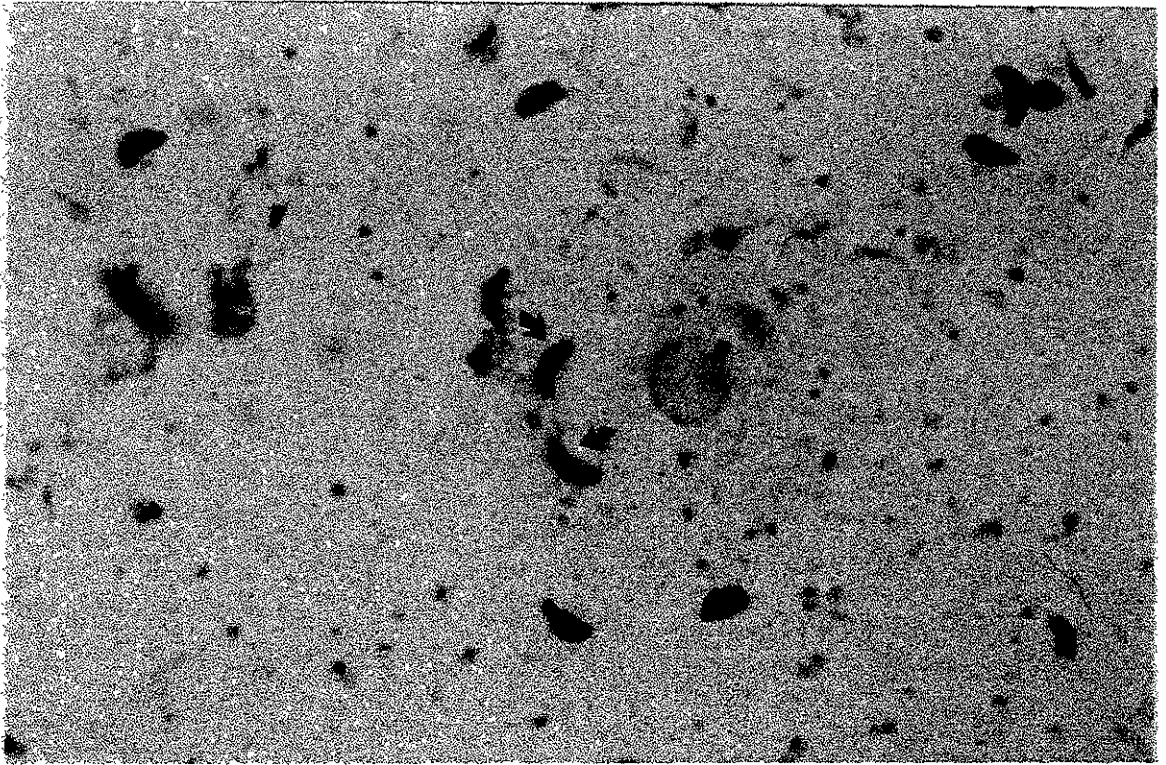


Figura 15. Microfotografía en la que se aprecian tachizoitos fuera de las células de cultivo (Flechas). 1000 X. I.P.

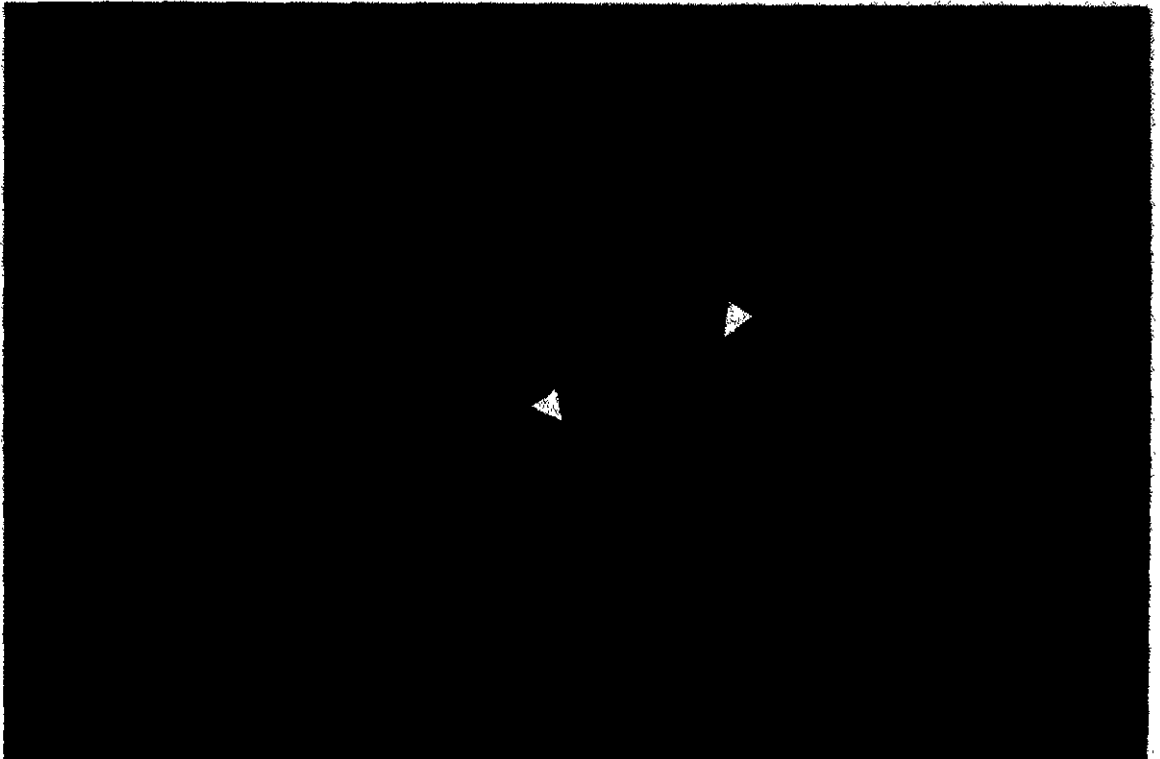


Figura 16. Microfotografía en la que se aprecian abundantes tachizoitos. I.F. Reacción positiva (Flechas). 400 X.