

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**MODELOS PARA LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL DE
PERROS CON TEJIDOS FETALES BOVINOS POSITIVOS
*A Neospora caninum***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

M A E S T R O E N C I E N C I A S

PRESENTA

JESÚS RAYMUNDO CEDILLO COBIÁN

TUTOR: DRA. ELIZABETH MORALES SALINAS

COMITÉ TUTORAL: DR. JOSÉ JUAN MARTÍNEZ MAYA

MC. VÍCTOR MANUEL BANDA RUIZ

MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi amada esposa Vianet A. Alvarez Cienfuegos, por todo tu amor, sacrificio y apoyo brindado durante este tiempo, por ser paciente en las circunstancias de nuestra estancia en la Ciudad de México, así como concederme una bebe más.

A mi hijo Virco e hija Zayami, quienes con sus sonrisas y su inocencia hacen mi vida feliz y me impulsan a ser mejor padre, esposo y maestro.

A mis Padres Jorge Cedillo y Elodia Cobián, por todo su amor y apoyo para mi formación personal y profesional, desde pequeño hasta el día de hoy.

A mis hermanos y hermanas, y todos mis familiares por sus expresiones de amor e interés en mi progreso.

AGRADECIMIENTOS

A mi querido Padre Celestial, fuente de toda sabiduría, por la salud y fuerza que me dio para superar mis temores y debilidades en esta etapa de mi vida. Por los rayitos de luz que iluminaron mi mente para entender un poco más de sus creaciones. Bendito seas por siempre...

A mi Tutora Dra. Elizabeth Morales Salinas, por haberme aceptado en el proyecto y por todo su apoyo y tiempo invertido durante la realización de esta investigación

A los Doctores Jose Juan Martínez Maya, Víctor Manuel Banda Ruiz y Enrique Aburto Fernández, por su valioso tiempo invertido en la revisión y mejoramiento de esta investigación, por sus consejos y motivación.

Al Dr. Héctor Quiroz R. por ser un ejemplo de calidad científica y docente, así como sus consejos y su ayuda en la revisión de este trabajo.

Al Departamento de Patología, encabezado por el Dr. Fernando Constantino Casas, por su confianza y todas las facilidades para el desarrollo de esta tesis. Así como a Cesar Maza, Félix Sánchez y Juan Manuel por su amistad y el tiempo compartido.

Al histotecnólogo Luis Antonio Morales Arreola y al laboratorista Miguel Ángel Martínez Ramírez por su apoyo en el trabajo de histopatología e inmunohistoquímica respectivamente.

A los miembros del Departamento de Parasitología, por las facilidades para la realización de los estudios coprológicos.

Se agradece a la UNAM por el financiamiento de esta investigación con el proyecto PAPITT clave IN 212603.

A la MC Cristina Guerrero Molina por su amistad y enseñanza, así como el apoyo brindado en tantos momentos

Al Dr. José Morales de INIFAP Palo Alto por las facilidades para el alojamiento de los perros, así como a Rogelio Solorio por su ayuda para el cuidado de los mismos.

Al personal del Laboratorio de diagnóstico en Salud Animal de Tizayuca, Hidalgo. Especialmente al MVZ Rafael Soto Castor, MVZ Antonio Vázquez por su gran apoyo y cooperación, y al MVZ Mario Santacruz, por el ejemplo de servicio desinteresado, su paciencia y el grandísimo apoyo brindado en todo tipo de circunstancias.

Al Instituto Tecnológico de Sonora, de quien soy honrosamente miembro de su personal académico, por velar para nuestro desarrollo e incluirnos en su misión y visión institucional.

A todos mis hermanos en la fe, del barrio Cuicuilco, Estaca Contreras, de la Iglesia de Jesucristo de los Santos de los Últimos Días, por su confianza, amor y servicio prestado.

CONTENIDO

	PAGINA
RESUMEN	vi
SUMMARY	vii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
Ciclo de vida	1
Sintomatología en el perro	2
Lesiones microscópicas	4
Transmisión	4
Epidemiología	6
Diagnóstico	7
Frecuencia serológica de neosporosis en perros.	7
Investigación en México	9
OBJETIVO GENERAL	11
Objetivos particulares	11
HIPOTESIS	11
MATERIAL Y MÉTODOS	12
1.- Primer modelo	12
2.- Segundo modelo	16
3.- Tercer modelo	18
4.- Análisis de los resultados	20
RESULTADOS	21
1.- Primer modelo	21
2.- Segundo modelo	21
3.- Tercer modelo	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

Con el propósito de evaluar tres modelos para inducir la infección experimental de perros con *Neospora caninum* a partir de tejidos fetales y neonatos bovinos positivos al parásito, se utilizaron 12 perros clínicamente sanos entre 2 y 10 meses de edad, sin tomar en cuenta la raza ni el sexo. Se descartó un posible contacto previo con el parásito a través del diagnóstico serológico por ELISA. Se obtuvieron 82 abortos y dos neonatos de 44 establos del CAITSA de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo, de donde se transportaron en refrigeración al Departamento de Patología de la FMVZ., UNAM. Las muestras de encéfalo, corazón, diafragma, hígado, pulmones, riñón y músculo esquelético se evaluaron por histopatología. Cinco de los 82 abortos (6.09%) fueron positivos a lesiones características causadas por *Neospora caninum* y solo uno de ellos con presencia de quistes intracelulares en el cerebro. Por medio de QHI los 5 casos fueron positivos a la presencia del parásito. De los dos neonatos seropositivos solo uno presentó lesiones microscópicas en cerebro, pero ambos fueron positivos a parásitos por QHI. Para inducir en los perros el desarrollo de las fases entéricas, se les proporcionó a cada perro 500g de tejidos fetales bovinos positivos y 600g de tejidos de neonatos seropositivos. Se colectaron muestras de heces diariamente, durante 3 semanas, las cuales se transportaron en refrigeración al Departamento de Parasitología de la FMVZ UNAM. Para identificar la eliminación de ooquistes, las muestras se analizaron por medio de la técnica de flotación fecal en solución de azúcar de Sheather. Se realizó un seguimiento para la detección de anticuerpos anti-*N caninum* por medio de ELISA tomando muestras de suero a los 45 días posinfección. Los perros fueron sacrificados humanitariamente para realizar la necropsia y examinar el intestino por histopatología e QHI. Ninguno de los perros eliminó ooquistes, seroconvirtió o desarrolló fases parasitarias enteroepiteliales. Los datos anteriores indican la dificultad para infectar a los perros con tejidos de bovinos positivos a *N caninum* bajo las condiciones de estos modelos en este experimento.

Palabras claves: Modelos, perros, infección, abortos, neosporosis

SUMMARY

With the purpose of evaluating three methods to induce the experimental infection of dogs with *Neospora caninum* starting from fetal tissues and positive bovine neonates to the parasite, 12 clinically healthy dogs between 2 and 10 months of age were used, unregarding the race and gender. Any possible previous contact with the parasite was ruled out through ELISA analysis. Eighty two abortions from 44 stables and two neonates of the CAITSA of Tizayuca, Hidalgo were obtained, and transported in refrigeration to the Department of Pathology of the FMVZ UNAM. The samples that consisted on encephalon, heart, diaphragm, liver, lungs, kidney and skeletal muscle were evaluated by histopathology, of which 5 positive abortions were identified through the characteristic lesions caused by *Neospora* and, one of them, through the presence of intracellular cysts in the brain, all the above-mentioned features were confirmed by immunohistochemistry. To induce the development of the enteric phases, the dogs were fed 500g of positive bovine fetal tissues and 600g of tissues from seropositive neonates. Fecal samples were collected daily during 3 weeks, and transported refrigerated to the Department of Parasitology of the FMVZ UNAM. In order to identify oocysts elimination, samples were analyzed by fecal flotation in solution of sugar of Sheather. To follow up for the presences of anti-*N caninum* antibodies ELISA analyses were performed 45 day post infection from serum samples. The dogs were euthanized to carry out the necropsy and evaluate the intestine for histopathology and QHI. The results indicated that none of the dogs eliminated oocysts in the fecal samples, seroconvert or developed parasitic phases in enteric epithelial. Alls the previous data indicate the difficulty to infect the dogs with *N caninum* positive bovine fetal tissues under the conditions of the models in these experiments.

Passwords: Models, dogs, infection, abortions, neosporosis

LISTA DE CUADROS

PÁGINA

Cuadro 1. Informes de frecuencia serológica de neosporosis en perros en diversas partes del mundo.	8
Cuadro 2. Endoparásitos identificados en los perros utilizados en los tres modelos.	37
Cuadro 3. Características de los dos abortos positivos a lesiones en el cerebro por <i>N caninum</i> del primer modelo	38
Cuadro 4. Características de los tres abortos positivos a lesiones en cerebro por <i>N caninum</i> del segundo modelo	39
Cuadro 5. Características de los dos becerros precalostrados positivos a anticuerpos anti- <i>N caninum</i> del tercer modelo	40
Cuadro 6. Hallazgos coprológicos en 10 perros residentes del CAITSA.	41

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

- FIGURA 1** Fotomicrografía del cerebro de un aborto del primer modelo. La flecha indica el foco de microgliosis. H/E 400x. 42
- FIGURA 2** Fotomicrografía del cerebro de un aborto del primer modelo. La flecha indica el foco de microgliosis. H/E 400x. 43
- FIGURA 3** Fotomicrografía del cerebro de un aborto del segundo modelo. La flecha señala el quiste tisular de pared gruesa, nótese la ausencia de reacción inflamatoria. H/E 1000x. 44
- FIGURA 4** Fotomicrografía del cerebro de un neonato precalostrado positivo a anticuerpos anti- *N caninum* del tercer modelo. La flecha indica el foco de microgliosis en la corteza cerebral. H/E. 100 X 45
- FIGURA 5** Fotomicrografía del cerebro de un neonato precalostrado positivo a anticuerpos anti- *N caninum* del tercer modelo. La flecha indica el quiste tisular presente en la corteza cerebral. QHI 1000 X (Elizabeth Morales S) 46
- FIGURA 6** Fotomicrografía del cerebro de un neonato precalostrado positivo a anticuerpos anti- *N caninum* del tercer modelo. La flecha indica uno de tantos taquizoitos en la corteza cerebral. QHI. 1000 X (Elizabeth Morales S) 47

INTRODUCCION

Neospora caninum es un parásito Apicomplexa de los animales, que hasta antes de 1988 fue confundido con *Toxoplasma gondii* ya que los taquizoitos y los quistes de estos dos parásitos son muy semejantes morfológicamente (Dubey et al., 1988b). Es un patógeno que causa enfermedad neuromuscular neonatal en el perro y es una de las principales causas de aborto bovino en muchos países. Ocasionalmente causa infecciones clínicas en caballos, ovejas, cabras y venados. (Dubey y Lindsay, 1996; Lindsay y Dubey, 2000; Dubey, 2003b)

Es uno de los parásitos de la vaca más eficientemente transmitidos y algunos hatos están infectados hasta en un 90 %. Los parásitos son transmitidos a la vaca vía ooquistes excretados por los perros o por vía transplacentaria que es considerada como la mayor ruta de transmisión. Los perros domésticos son conocidos como los huéspedes definitivos (McAllister et al., 1988; Lindsay et al., 1999a; Lindsay et al., 2001). Recientemente se ha demostrado, que también los Coyotes (*Canis latrans*) son huéspedes definitivos del parásito (Gondim et al., 2004).

Ciclo de vida. El perro es tanto huésped intermediario como huésped definitivo de *N. caninum* (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999a) El ciclo de vida está tipificado por tres estados infecciosos: taquizoitos, quistes tisulares y ooquistes. Los taquizoitos y quistes tisulares son los estados que se encuentran en los huéspedes intermediarios y estos se presentan intracelularmente (Dubey et al., 2002). Los taquizoitos miden 6 x 2 μm . Los quistes tisulares son redondos u ovals y miden hasta 107 μm de diámetro y se encuentran principalmente en el sistema nervioso central. La pared del quiste es gruesa de 4 μm y encierra bradizoitos los cuales miden de 7-8 x 2 μm . Los quistes tisulares de pared delgada (0.3 -1.0 μm) han sido recientemente descritos en músculos de vacas y perros naturalmente infectados con parásitos semejantes a *N. caninum* (Peters et al.,

2001). Éstos no han sido vistos ni encontrados en animales infectados experimentalmente (Dubey et al., 2002).

Los perros domésticos son conocidos como huéspedes definitivos para *N. caninum* (McAllister et al., 1988). También pueden ser huéspedes intermediarios cuando consumen ooquistes provenientes de otros perros infectados (Lindsay y Dubey, 2000). Los ooquistes no esporulados de perros infectados de forma experimental miden 11.7 x 11.3 (10.6 -2.4 x 10.6 -12.0) μm de tamaño (Lindsay et al., 1999a), los cuales esporulan fuera del huésped y se induce la esporulación en tres días como lo informa (McAllister et al., 1988), o mezclándolos en ácido sulfúrico al 2%, a 37° C o entre 22 a 25° C en 24 horas (Lindsay et al., 1999a). Son similares morfológicamente a los de *Toxoplasma gondii* y *Hammondia hammondi* en heces de gato y a los ooquistes de *Hammondia heydorni* en heces de perros (Dubey et al., 2002) (Slapeta et al., 2002).

Los ooquistes no esporulados se convierten en esporulados en el suelo y pueden contaminar el agua y el alimento de otros animales. Al ser consumidos por algún huésped intermediario como los rumiantes, caballos entre otros animales salvajes, los ooquistes liberan a los esporozoitos que infectan el intestino delgado. Los esporozoitos en el intestino, se dividen por endodiogenia y se convierten en taquizoitos los cuales son las fases de multiplicación rápida del parásito, capaces de infectar posteriormente al músculo esquelético y cardiaco, hígado, sistema nervioso central (SNC) y tejido conjuntivo principalmente. Los quistes con bradizoitos representan a las fases de multiplicación lenta del parásito y solamente se han identificado en el SNC, nervios periféricos y retina (Dubey y Lindsay, 1996; McAllister et al., 1998; Dubey, 1999a; Dubey, 1999b; French et al., 1999; Dubey, 2003ab).

Sintomatología en el perro. Como huéspedes definitivos (infectados experimentalmente) no se presentan signos clínicos (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999a; Gondim et al., 2002) pero como intermediarios, los perros

pueden verse afectados a cualquier edad, sin predisposición de raza o sexo. La mayoría de los casos descritos implican a varios miembros de camadas en los que los signos clínicos aparecieron entre las 2 y las 20 semanas de edad, pero han habido casos confirmados en perros tan jóvenes como de dos días de edad (Barber y Trees., 1996) y tan viejos como de 15 años (Dubey et al., 1988a). Se han descrito casos en forma individual, así como en grupos de perros relacionados y en perros de zonas rurales y urbanas. Estudios experimentales indican que *N. caninum* puede causar muerte fetal, momificación, reabsorción y nacimiento de cachorros débiles, pero no ha habido ningún informe de aborto debido a neosporosis en perros. También los cachorros pueden desarrollar neosporosis clínica si se infectan postnatalmente. La inmunosupresión, ya sea natural o inducida, puede exacerbar la enfermedad (Dubey y Lindsay, 1996).

El síndrome descrito más comúnmente implica una paresia de miembros pélvicos que progresa hasta la parálisis y debilidad de miembros torácicos por deficiencia de los nervios craneales. La muerte se produce como consecuencia de la parálisis progresiva y meningoencefalomielitis, insuficiencia cardiaca y neumonía. El curso de la enfermedad es variable y en los casos hiperagudos mueren durante la primera semana en la que se notan los signos. En otros casos el curso es mucho más crónico y los signos progresan gradualmente durante varias semanas. (Barber y Trees, 1996).

Inicialmente los dueños notan un tipo de marcha como de “saltos de conejo”, una apatía para saltar o que las miembros se abren cuando el perro esta sentado. La paresia de los miembros pélvicos puede ser uni o bilateral. La parálisis puede ser flácida o espástica; en alrededor de la mitad de los casos se desarrolla una hiperextensión rígida de la rodilla y/o el tarso en uno o ambos miembros pélvicos. La incontinencia urinaria es rara al principio, pero puede desarrollarse a medida que la enfermedad progresa. La fiebre y la inapetencia son raras, la mayoría de los perros permanecen concientes y alertas hasta la muerte (Barber y Trees, 1996).

En la mayoría de los casos, el examen físico revela signos, pero la presentación puede ser variada y no todos los signos se desarrollan simultáneamente. De esta manera los signos clínicos progresan hasta producir paresia/parálisis de los miembros torácicos, depresión, alteración de los reflejos oculares, (por ejemplo, reflejos pupilares lentos, anisocoria, estrabismo, ptosis, nistagmus) inhabilidad para abrir o cerrar la mandíbula, dificultad para deglutir y disnea. En esta fase la mayoría de los perros son sacrificados (Barber y Trees, 1996; Dubey y Lindsay, 1996).

Hay casos ocasionales que pueden presentar o tener signos asociados a lesiones cardiacas (muerte súbita), pulmonares (tos, letargia y pirexia), dermatológicas (dermatitis hemorrágica, ulcerosa, necrótica, piogranulomatosa multifocal). También puede haber hepatitis, pancreatitis o adrenalitis, ya que los taquizoitos de *N caninum* han producido necrosis en estos órganos (Dubey et al., 1988a) dando lugar a signos clínicos tales como vómitos y polidipsia así como complicaciones neuromusculares (Barber y Trees, 1996). Los valores hemáticos, usualmente no se alteran. Puede haber un incremento en los niveles de enzimas séricas asociado a necrosis de los miocitos o hepatocitos (Lindsay y Dubey, 2000).

Lesiones microscópicas. En casos de neosporosis clínica, los hallazgos *post mortem* de cachorros son principalmente meningoencefalomielitis linfocítica y microgliosis, neumonía, miositis, miocarditis y poliradiculoneuritis linfocítica. Esta diversidad de lesiones, hace necesario el diagnóstico igual que en el caso de los bovinos, por inmunohistoquímica (QIH) o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar parásitos (Dubey y Lindsay, 1990; Hay et al., 1990; Ruehlmann et al., 1995; Barber et al., 1996. Lindsay y Dubey, 2000).

Transmisión. Poco se sabe acerca del modo de dispersión y distribución en los tejidos de los animales usando las rutas naturales de transmisión. El parásito

puede ser transmitido transplacentariamente en varios huéspedes, siendo la ruta vertical el mejor modo de transmisión. Los carnívoros pueden adquirir la infección por ingestión de tejidos infectados. (McAllister et al., 1998, Lindsay et al., 1999a, 1999b; Dijkstra et al., 2001 ; Shares et al., 2001 Gondim et al., 2002). Es epidemiológicamente importante identificar ooquistes en las heces de los perros lo cual no siempre resulta sencillo ya que el examen microscópico no es suficiente para identificar los ooquistes de *N. caninum* en las heces de estos animales (Dubey, 2003a). Por ello, se han desarrollado métodos para distinguir genéticamente los ooquistes de *N. caninum* de otros ooquistes como los de *Hammondia heydorni*. (Hill et al., 2001). Ooquistes de *N. caninum* han sido identificados en heces de perros naturalmente infectados (Basso et al., 2001a; Slapeta et al., 2002; McGarry et al., 2003; Shares et al., 2005).

Actualmente no hay un modelo animal que sustituya a los perros para mejorar las pruebas que detecten ooquistes de *N. caninum* en las heces. Aunque algunos ratones “Knockout” (KO) son utilizados para el aislamiento del parásito a partir de tejidos, ya que son altamente susceptibles a la inoculación parenteral con taquizoitos y quistes tisulares (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey et al., 1998), aunque son menos susceptibles a la inoculación oral o parenteral con ooquistes (Dubey y Lindsay., 2000; Basso et al., 2001a; Schares et a.,l 2001). Otras especies de gerbos, *Meriones tristrami* y ratas de arena (*Psammomys ubesus*) también son susceptibles a la infección con taquizoitos (Pipano et al., 2002).

En un estudio realizado por Lindsay et al., (2001) uno de tres perros alimentados con cerebros de ratón conteniendo quistes tisulares excretó ooquistes en las heces. Los resultados indican que un simple taquizoito de *N caninum* contiene toda la información genética necesaria para producir los ciclos sexual y asexual en el intestino canino. Se han logrado obtener ooquistes de *N. caninum* de perros que han sido alimentados con cerebros de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) naturalmente infectados (Rodrigues et al., 2004), y de cerebros de venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) naturalmente infectados (Gondim et al., 2004).

Epidemiología. En la naturaleza no se conoce como se infectan los perros ya que animales pequeños que los perros pueden cazar y consumir no han sido identificados como huéspedes naturales de *N. caninum*. El consumo de fetos bovinos abortados parece no ser una fuente frecuente de infección en esta especie (Bergeron et al., 2001b), además el consumo de membranas placentarias también puede ser una fuente de infección ya que los parásitos han sido encontrados en placentas naturalmente infectadas y los perros alimentados con ellas han eliminado ooquistes (Dijkstra et al., 2001; Bergeron et al., 2001a; Dijkstra et al., 2002).

Poco se conoce sobre la frecuencia de eliminación de ooquistes por los perros, ni tampoco de su resistencia en el ambiente. Sin embargo, Gondim et al., (2002) realizaron un experimento en donde 9 perros fueron alimentados con tejidos de terneras infectadas con *Neospora* y la producción fue de 160,700 ooquistes en promedio, mientras que en otros 6 perros que fueron alimentados con cuerpos de ratones también positivos, produjeron 5,400 ooquistes en promedio. El periodo prepatente fue de 5 a 10 días. Además demostraron la transmisión cíclica entre perros y bovinos. Lindsay et al., (1999) confirmaron que el periodo de prepatencia es de 5 días.

No debe permitirse a los perros comer fetos abortados, membranas fetales o terneros muertos. (Dubey, 2003a) ya que puedan contener taquizoitos o bradizoitos de *N. caninum* y por ende, eliminar ooquistes (Thurmond y Hietala 1995, 1996; Innes et al., 2001, 2002). Varios estudios sugieren que la cohabitación de perros y vacas es un factor de riesgo para la infección de *N. caninum* (Cabassi et al., 2001ab; Sánchez et al., 2003), drogas que puedan prevenir la transmisión de los parásitos de las madres a los fetos son desconocidas pero la investigación continúa en esta área (Dubey, 2003a).

La importancia de los perros en la epidemiología de la neosporosis bovina no está todavía clara. Es probable que los ooquistes de *N. caninum* de las heces del perro puedan servir como fuente de infección para el ganado (Cabassi et al., 2001b). La infección del ganado con ooquistes vía oral se demostró experimentalmente (Trees, et al., 2002) pero no en la naturaleza. Estudios recientes han mostrado que los parásitos aislados a partir de canino y bovino son el mismo organismo. A pesar de la investigación activa durante una década, muy poco se conoce sobre los mecanismos de transmisión horizontal, aunque la transmisión vertical está bien documentada (Antony y Williamson, 2001).

Diagnóstico. Usualmente se usan para detectar anticuerpos anti-*N. caninum* en los perros pruebas serológicas como la aglutinación directa para *Neospora* (NAT) (Barber y Trees, 1996; Romand et al., 1998), la prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos (IFAT) (Dubey y Lindsay, 1996). Y la prueba de ELISA (Björkman et al., 1994; William et al., 1999; Larsen et al., 2004).

Frecuencia serológica de neosporosis en perros. Hay varios informes de los hallazgos serológicos que se han obtenido utilizando como pruebas diagnósticas NAT o ELISA. Se indican en el cuadro 1, el país de origen de los perros, el número de animales analizados, el resultado obtenido y cuando se menciona el tipo de perro, se refiere a cuál es la actividad que realizan los perros en el lugar donde se muestrearon y la cita correspondiente.

Cuadro 1. Informes de frecuencia serológica a neosporosis en perros en diversas partes del mundo

Lugar	Número de perros	Frecuencia	Tipo	Cita
Italia	194	(29%)		(Cringoli et al., 1996)
Australia	451	(9%)		
Uruguay	414	(20%)		
Isla de Falkland	500	(0.2%)		
Kenia	140	(0%)		(Barber et al., 1997a)
Bélgica	300	(11%)		(Barber et al., 1997b)
Nueva Zelanda	200	(22%)		(Reichel et al., 1998)
Japón	48	(31%)	establo	
	198	(7%)	urbanos	(Sawada et al., 1998)
Los Países Bajos	152	(23.6%)	de granja	
	344	(5.5%)	urbanos	(Wouda et al., 1999b)
Turquía	150	(10%)		(Coskun et al., 2000)
Argentina	125	(48%)	establo	
	35	(54.2%)	rancho	
	160	(22.2%)	urbanos	(Basso et al., 2001b)
Argentina	320	(37.8%)		(Basso et al., 2001b)
Brasil	163	(6.7%)		(Mineo et al., 2001)
Chile	120	(12.5%)	urbanos	
	81	(26%)	rurales	(Patituci et al., 2001)
Alemania	50	(4%)	sin signos	
	200	(13%)	con signos	(Klein y Muller, 2001)
Italia	335	(18.2%)	urbanos	
	67	(37.3%)	establo	(Cabassi et al., 2001b)
Brasil (Paraná)	134	(21.6%)	establo	(Souza et al., 2002)
Brasil	500	(10%)	mascotas	
	611	(25%)	callejeros	(Gennari et al., 2002)
Italia	1058	(6.4%)		(Cringoli et al., 2002)
México	27	(51%)	granja	
	30	(20%)	Ciudad	(Sanchez et al., 2003)
Egipto	29	(27.5%)		(El-Ghaysh et al., 2003)
Nueva Zelanda	150	(30.7%)	urbanos	
	161	(74.5%)	de establo	(Anthony y
	154	(96.8%)	granjas de ovejas	Williamson, 2003)
Italia	282	(18%)		(Kramer et al., 2004)

Investigación en México. El primer informe de aborto bovino asociado a neosporosis realizando el diagnóstico por medio de histopatología e IHQ en México, lo llevaron a cabo Morales et al., (1997). Posteriormente, en una encuesta serológica realizada en algunos hatos lecheros mexicanos entre 1997 y 1999 se encontró una frecuencia por serología del 72%, con tasas de aborto entre el 13 y 30% anualmente y del 36% en hatos con tasas de aborto hasta del 12% anual (Morales et al., 2001a). Otro estudio serológico realizado por García et al., (2002), en Aguascalientes, informó que de 187 animales de 13 hatos, el 59% fueron positivos a anticuerpos anti-*N. caninum*, así como el 100% de los hatos.

En un estudio histopatológico y por QHI efectuado en 211 fetos abortados de las principales cuencas lecheras mexicanas realizado por Morales et al., (2001b), se encontraron lesiones características de neosporosis en 73 (35%). Los tejidos de 41 fetos de 53 con estas lesiones (78%) fueron positivos a la presencia de parásitos por QHI. Sánchez et al., (2003) realizaron el primer estudio serológico de neosporosis en perros de México, comparando la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* entre perros de establo y de ciudad, así como en vacas de establos con y sin perros, encontrando que la frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* fue significativamente alta en perros de establo (51.85%) con respecto a los de ciudad, y la frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en vacas fue significativamente mayor en establos con perros.

Jacobo (2004) colectó muestras sanguíneas de 460 bovinos hembras mayores de 6 meses de edad de 14 hatos, del distrito de Desarrollo Rural # 148, en Cajeme, Sonora. Y mediante la prueba de ELISA se determinó una frecuencia del 32.3%. Álvarez et al., (2004) mediante ELISA observaron respuesta positiva en sueros de 170 vacas (40%) de 422 muestreadas de Tizayuca, Hidalgo. Tres abortos fueron positivos por PCR lo que representó el 6.2% de los fetos analizados.

En un estudio reciente realizado por García et al., (2005) en 20 hatos lecheros de cinco regiones en México, con una muestra de 813 bovinos, la prevalencia serológica fue del 42% dicha positividad fue asociada al aborto, y en conjunto, se atribuyeron 26% a *N. caninum*.

Hasta el momento, la investigación indica que *N. caninum* está ampliamente difundida en hatos bovinos a nivel mundial y que principalmente los perros de establo juegan un papel importante en la transmisión. Se ha demostrado que el perro es un huésped definitivo, lo cual se logró de forma experimental con la administración de ratones infectados, y solo hay tres informes de eliminación de ooquistes por infección natural. Los ooquistes eliminados en el excremento han sido plenamente identificados, a pesar de ello, hay poca información sobre la identificación, caracterización y multiplicación de las fases enteroepiteliales de este parásito, la frecuencia de eliminación de los ooquistes y del tiempo en que éstos permanecen viables en el excremento de los perros. El ciclo completo del parásito en el perro se desconoce, las únicas fases extraintestinales identificadas en éste son los taquizoitos y los bradizoitos en casos de neosporosis clínica.

Todavía no se conoce lo suficiente sobre la capacidad infectiva de los tejidos fetales bovinos que son ingeridos por los perros. Varios informes de investigación detallan los precisos manejos que se requieren para reproducir la neosporosis entérica en los perros. Sin embargo, son escasos los que han intentado reproducirlo a partir del consumo directo de placentas y tejidos fetales positivos al parásito, como podría suceder en la naturaleza.

Por lo antes expuesto, la presente investigación contribuye con los resultados que se obtuvieron al aplicar tres diferentes modelos para la infección de perros a partir de tejidos fetales y neonatales bovinos positivos al parásito y se proponen medidas para prevenir la neosporosis en las poblaciones animales expuestas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar tres modelos de infección experimental en perros con tejidos fetales y neonatos de bovino positivos a *Neospora caninum*.

Objetivos particulares.

- 1.- Identificar muestras positivas a *Neospora caninum* en tejidos fetales de bovino a través de histopatología e inmunohistoquímica.
- 2.- Inducir el desarrollo de las fases entéricas (esquizogonia y gametogonia) de *Neospora caninum* en perros a través de la administración oral de tejidos de fetos y neonatos de bovino positivos a neosporosis.
- 3.- De acuerdo a los resultados de este estudio, proponer medidas de prevención y control para las poblaciones animales expuestas al parásito.

HIPOTESIS

La administración oral en perros de tejidos fetales y neonatales bovinos positivos a neosporosis produce el desarrollo de fases entéricas de *Neospora caninum*

MATERIAL Y METODOS

1.- PRIMER MODELO

a) Obtención de tejidos fetales de bovino. De agosto a noviembre del 2004 se recibieron 40 fetos de 7 a 8 meses de desarrollo y que no tenían mas de 7 días de haber sido abortados, los cuales procedían de 22 establos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca Sociedad Anónima (CAITSA) localizado en la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo. Ubicada en el Kilómetro 51.5 de la carretera libre México– Pachuca, estos establos cuentan con antecedentes de neosporosis confirmada por estudios previos (Morales et al, 1997; 2001a; 2001b)

En la sala de Necropsias del CAITSA, se realizó la disección de estos fetos obteniéndose el encéfalo, corazón, pulmones, diafragma, hígado, riñón y músculo esquelético. Parte de estos tejidos fueron fijados en formalina al 10% a un pH de 7.4 para su estudio histopatológico, el resto se transportó inmediatamente en refrigeración al Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM.

b) Manejo de los tejidos que fueron utilizado como fuente de infección. Con el fin de identificar tejidos positivos a *N caninum* las muestras de los tejidos previamente ciatdos que fueron fijados en formalina al 10% al menos por 24 horas, se procesaron por la técnica histológica de rutina, para ser incluidos en parafina, cortados a 4µm de grosor y teñidos con Hematoxilina y Eosina (H.E.). Las porciones de tejidos que se utilizaron para administrarse a los perros, se conservaron a 4 °C hasta que por histopatología se reconociera algún caso positivo, es decir, cuando estos presentaron lesiones características o por la presencia de parásitos. Los casos positivos fueron preparados como alimento. Las muestras que no fueron positivas se eliminaron por incineración.

Los casos positivos a lesiones de neosporosis por histopatología en todos los modelos de esta investigación, se confirmaron por inmunohistoquímica (QHI) usando la técnica del Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (CAPB-P) como se describe a continuación:

- Las secciones tisulares incluidas en parafina, fueron cortadas a 3 μm de grosor y adheridas en laminillas preparadas con una solución adhesiva. En este caso se utilizó Poli-L-Lysina¹.
- Se desparafinaron a 60° C durante 60 minutos y posteriormente fueron sumergidas en xilol en dos cambios de 20 minutos cada uno y en acetona en dos cambios de 5 minutos cada uno, alcohol etílico absoluto realizando 2 cambios de 5 minutos cada uno. Posteriormente se llevó a cabo la rehidratación de los tejidos sumergiendo las laminillas en alcoholes a diferentes concentraciones (96%, 80%, 50%) dos cambios de 5 minutos cada uno y finalmente en agua destilada 3 cambios de 5 minutos cada uno.
- Para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena, las laminillas fueron tratadas con peróxido de hidrógeno en metanol (proporción 1:8) durante 30 minutos.
- Lavados con solución de fosfatos (Tris)² con tres cambios de 5 minutos cada uno
- Con el fin de exponer antígenos parasitarios intracelulares, se procedió a realizar una digestión enzimática de los tejidos utilizando una solución de proteasa³ diluida al 0.1%, con solución amortiguadora de fosfatos, y se incubó en cámara húmeda durante 10 minutos a 37° C. Después de la digestión, se decantó la proteasa y se agregó la primera solución bloqueadora⁴, para dejar posteriormente en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- Los tejidos se lavaron con Tris con tres cambios de 5 minutos cada uno.
- Se decantó el Tris y se agregó la segunda solución bloqueadora⁴, para dejar posteriormente en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 45 minutos.

1 Poly-L-Lysine Solution.SIGMA-ALDRICH CO. PO Box 14504 St Louis MO 63178 USA. tel 314-771-5750

2 Trisma Base SIGMA- ALDRICH CO. Tris Hydrochloride ICN Biomedicals, Inc. 1263 South Chillicote Road Aurora, OHIO 44202 1-800-854-0530

3 Proteasa. SIGMA- ALDRICH CO

4 Endogenous Avidin/Biotin Blocking Kit. ZYMED Laboratories Inc. 561 Eccles Avenue. South San Francisco, CA 94080 Tel. 650-871-4494. Web Site www.zymed.com

- Los tejidos se lavaron con Tris con tres cambios de 5 minutos cada uno.
- Se aplicó el anticuerpo primario⁵ anti- *N caninum* producido en cabra a una dilución de 1: 1000 y se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente.
- Después de la incubación los tejidos se lavaron con Tris con tres cambios de 5 minutos cada uno.
- Posteriormente se aplicó el anticuerpo secundario biotinilado⁶ producido en ratón anti-cabra, y se incubó en cámara húmeda durante 30 minutos a 37° C.
- Después de la incubación los tejidos se lavaron con Tris con tres cambios de 5 minutos cada uno.
- Se procedió a aplicar el conjugado de enzima⁷ (estreptoavidina) y se incubó en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Después de la incubación los tejidos se lavaron con Tris con tres cambios de 5 minutos cada uno.
- Posteriormente se reveló las laminillas aplicando el cromógeno. En este caso se utilizó una solución de aminoetil carbazol⁸ con peróxido de hidrógeno durante 3 minutos a temperatura ambiente y se realizó un lavado con agua destilada.
- Finalmente las secciones tisulares se lavaron con agua destilada y se incluyeron por 5 minutos, contrastándose con Hematoxilina⁹ de Mayer durante 4 minutos. Las laminillas se prepararon en solución de montaje¹⁰ para la observación con el microscopio óptico. Se consideraron positivas cuando había quistes tisulares con bradizoitos o solo taquizoitos de *N caninum*. teñidos de color café ocre característico.
- Para evaluar el proceso inmunológico se utilizaron como testigos positivos y negativos laminillas con secciones de cerebro de un becerro que contenían quistes tisulares con bradizoitos de *N caninum*.

5 Anti-N.caninum Antisera. VMRD Inc. PO Box 502 Pullman, WA 99163 USA.

Tel 1 (509) 334- 5815

6 Biotynilated, Affinity- Purified Mouse Anti-Goat IgG. Biocare Medical. 2940 Camino Diablo, Suite 300, Walnut Creek, CA 94597. Tel 800-799-9499 www.biocare.net

7 Streptavidin Peroxidase Conjugate. ZYMED.

8 Aminoethyl Carbazole Substrate Kit. ZYMED.

9 Hematoxylin Counterstain reagent. ZYMED.

10 GVA Mount (Muonting Solution). ZYMED.

c) Selección y preparación de los perros. Se utilizaron 3 perros criollos, hermanos, de un mes de edad. Para confirmar que todos los animales estuvieran clínicamente sanos, se les practicó un hemograma, química sanguínea y estudio coproparasitoscópico para determinar la presencia de helmintos o coccidias. Además se les tomó una muestra sanguínea para la obtención de suero para la determinación de anticuerpos anti-*N. caninum* utilizando el método de ELISA por bloqueo*. Las muestras se consideraron como positivas a anticuerpos anti-*N. caninum* cuando el porcentaje de inhibición fue igual o menor al 45 %. El porcentaje de inhibición se calculó, como lo indica el fabricante con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{DO 450 de la muestra analizada}}{\text{DO del testigo negativo}} \times 100$$

DO= Densidad óptica

Los animales permanecieron separados en jaulas individuales y cada uno fue identificado y observado diariamente. El alojamiento se llevó a cabo en las instalaciones del INIFAP, CENID Microbiología ubicado en la carretera México Toluca Km 15.5. Todos los animales fueron alimentados con dieta comercial y una vez a la semana se les administró trozos de pollo crudo, a fin de garantizar el consumo de los tejidos fetales posteriormente.

d) Infección experimental en perros. Para inducir la infección experimental a cada uno de los tres perros, se les administró, por una sola ocasión fracciones de los tejidos fetales bovinos crudos del mismo feto que por histopatología resultó positivo a la presencia de lesiones.

e) Seguimiento serológico y coprológico de los perros. A los perros se les obtuvo una muestra de sangre para obtener suero el día 45 después de la administración del alimento preparado, con el fin de determinar la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* utilizando el método de ELISA por bloqueo.

* Serological detection of specific antibodies to *Neospora caninum* by blocking ELISA method. Institut Pourquier. Biotecnología Industrial SA de CV. Darwin No.68-201 Col Anzures, México D.F. México. CP 11590 Tel 5254-83-35/ 5203-11-98. Fax 5531-16-47 www.btimex@avantel.net

Con el fin de identificar ooquistes de *N. caninum*, durante 3 semanas y a partir del segundo día de que los animales consumieron los tejidos fetales crudos se colectaron diariamente la totalidad de las heces de cada perro, Después de recoger las heces, se aplicó por aspersión una solución 1:100 de monopersulfato de potasio* y posteriormente se lavó con agua y detergente el lugar. También, se utilizó un tapete sanitario para lavar las botas después de atender a los perros inoculados. Una porción de heces de cada perro fue examinada siguiendo la técnica de flotación fecal en solución de azúcar de Sheather (densidad 1:28) (Hill et al., 2001) esperando observar la presencia de los ooquistes.

2.- SEGUNDO MODELO

a) Obtención de tejidos fetales de bovino. Se llevó a cabo de diciembre del 2004 a junio del 2005, mediante la obtención de tejidos de 42 fetos de bovino abortados entre 7 y 8 meses de edad, procedentes de 30 establos del CAITSA, a cada feto se le practicó la necropsia y se obtuvo el encéfalo, corazón, pulmones, diafragma, hígado, riñón y músculo esquelético. Parte de estos tejidos fueron fijados en formalina al 10% a un pH de 7.4 para su estudio histopatológico. Las muestras fueron procesadas de la misma forma como se describe para el modelo 1. El resto de los tejidos se transportaron inmediatamente en refrigeración a las instalaciones del INIFAP, CENID Microbiología para ser administrado como alimento.

b) Manejo de los tejidos que fueron utilizado como fuente de infección. Las porciones de tejidos que se utilizaron para infectar a los perros se administraron el mismo día que se recibieron, solo cuando se realizó la necropsia al feto en las instalaciones de la FMVZ UNAM, este se administró hasta el día siguiente. Este procedimiento aumentó la cantidad de tejidos que se proporcionó a cada perro. La transportación de las muestras se mantuvo a temperatura de refrigeración (4 °C).

*Virkon, Bayer de México SA de CV. M de Cervantes Saavedra No 259, Col Ampliación Granada. CP 11520 México D.F. Tel 5728-3000

c) Selección y preparación de los perros. Se utilizaron 9 perros criollos de ambos sexos, divididos en tres grupos de tres cachorros hermanos con edades de 2, 5 y 7 meses. Se confirmó que todos los animales estuvieran clínicamente sanos, previo a la inoculación. Los animales permanecieron separados en jaulas individuales y cada uno fue identificado y observado diariamente. El alojamiento se llevó a cabo en las instalaciones del INIFAP, CENID microbiología. Todos los animales fueron alimentados con dieta comercial y una vez a la semana se les administraron trozos de pollo crudo.

d) Infección experimental en perros. Para intentar inducir el desarrollo de las fases enteroepiteliales de *N. caninum* a los perros, se les administró como alimento por una sola ocasión los tejidos fetales bovinos crudos que se obtuvieron en ese día, antes de que se hiciera el diagnóstico histopatológico que indicara cual caso era positivo a neosporosis. El tiempo de almacenamiento en refrigeración fue de 12 a 48 hr post aborto.

e) Seguimiento coprológico de los perros. La evaluación de las heces por medio del estudio coprológico se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Parasitología de la FMVZ UNAM, a partir del segundo día, hasta el día 20 posinfección. Para ello, una porción de heces fueron examinadas siguiendo la técnica de flotación fecal en solución de azúcar de Sheather (densidad 1:28) (Hill et al., 2001).

f) Evaluación histopatológica del intestino de los perros. Al finalizar este modelo los perros ya de 8, 11 y 13 meses de edad fueron sacrificados de forma humanitaria con sobredosis (2ml por cada 2.5 kg de peso vivo) de pentobarbital sódico¹ vía intravenosa. Se realizó la necropsia, se tomaron muestras del intestino en todas sus porciones, las cuales fueron fijadas en formalina al 10% a un pH de 7.4, procesadas por la técnica histológica de rutina, incluidas en parafina cortadas

¹ Anestesal, Pfizer SA de CV. Salud Animal. Km 63 Carretera México-Toluca, Toluca Edo de México, México.

a 4µm de grosor y teñidas con H.E. Las preparaciones histológicas del intestino, fueron observadas detalladamente por medio del microscopio óptico. Además se sometieron a la prueba de QHI para determinar la presencia de parásitos de *N caninum*.

3.- TERCER MODELO

a) Obtención de los tejidos de neonatos bovinos: Con el propósito de identificar animales positivos al parásito se procedió a evaluar a 5 becerros neonatos que aún no hubieran consumido calostro. Para ello se visitaron varios establos, en ellos se tomó una muestra de sangre de los becerros que nacieron en el transcurso del día, la noche y la mañana.

Las muestras de sangre se transportaron en refrigeración al laboratorio de pruebas y diagnóstico en salud animal del CAITSA, donde se separaron los sueros y se procedió a identificar animales positivos a anticuerpos anti-*N caninum* utilizando el método de ELISA indirecta*. Las muestras se consideraron positivas cuando el porcentaje del valor de la muestra fue mayor a 50%, para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ valor} = \frac{\text{DO de la muestra} - \text{DO del testigo negativo}}{\text{DO del testigo positivo} - \text{DO del testigo negativo}} \times 100$$

DO= Densidad Óptica

De los animales que resultaron positivos, se adquirieron dos de ellos y se transportaron a la sala de necropsias del mismo complejo agropecuario, donde fueron sacrificados y se obtuvieron los siguientes órganos: cerebro, cerebelo, médula espinal, corazón e hígado. Una pequeña parte de estos órganos fueron depositados en formalina al 10% con pH 7.4, para su posterior estudio histopatológico e inmunohistoquímico.

* Chekit- Neospora Enzyme Immuno-Assay (EIA). Bommeli Diagnostics Intervet. AV. Paseo de los Frailes No. 22 Parque Industrial, Santiago Tiaguistenco. 52600, Edo. De México, México.

b) Selección y preparación de los perros. Se utilizaron 3 cachorros hermanos de raza Poodle de ambos sexos, que al inicio del modelo tenían 5 semanas de edad. Se confirmó que todos los animales estuvieran clínicamente sanos. Los animales permanecieron separados en jaulas individuales y cada uno fue identificado y observado diariamente. El alojamiento se llevó a cabo en las instalaciones del INIFAP, CENID Microbiología. Fueron alimentados con dieta comercial y una vez a la semana se les administraron trozos de pollo crudo.

c) Infección experimental en perros. Los tres cachorros ya de 8 semanas de edad fueron transportados al CAITSA. Aproximadamente una hora después del sacrificio de los becerros, se les proporcionó 600 gr de una mezcla de los tejidos antes citados en trozos pequeños de ambos becerros y posteriormente se reinstalaron a su confinamiento individual en el INIFAP, CENID Microbiología.

d) Seguimiento coprológico de los perros. Con el fin de identificar ooquistes de *N. caninum*, a partir del segundo día de que los animales consumieron los órganos de los neonatos crudos, la totalidad de las heces de cada perro se colectaron diariamente durante 16 días, luego se aplicó por aspersión una solución 1:100 del desinfectante monopersulfato de potasio* y posteriormente se lavó con agua y detergente. También, se utilizó un tapete sanitario para lavar las botas después de atender a los perros inoculados. Las heces se transportaron en refrigeración al Departamento de Parasitología de la FMVZ UNAM, en donde el contenido de cada bolsa fue homogenizado y una muestra de 15 gr fue examinada en forma duplicada, siguiendo la técnica de flotación fecal en solución de azúcar de Sheather (densidad 1:29) (Hill et al., 2001).

e) Evaluación histopatológica del intestino de los perros. Con el fin de identificar el posible desarrollo de las fases enteroepiteliales de *N. caninum*, a los días 9, 12 y 16 postinfección, se sacrificó un cachorro respectivamente, de forma

* Virkon, Bayer de México SA de CV.

humanitaria con sobredosis (2ml por cada 2.5 kg de peso vivo) de pentobarbital sódico* vía intravenosa, para posteriormente realizar la necropsia. Se tomaron muestras del intestino en todas sus porciones, y fueron fijadas en formalina al 10% a un pH de 7.4, procesadas por la técnica histológica de rutina, incluidas en parafina, cortadas a 4µm de grosor y teñidas con H.E. Las preparaciones histológicas del intestino, fueron observadas detalladamente por medio del microscopio óptico. Además se sometieron a la prueba de QHI para determinar la presencia de parásitos de *N caninum*.

Muestreo coprológico alterno en perros residentes del CAITSA.

Con el propósito de intentar el desarrollo de las fases enteroepiteliales de *N caninum* en perros a través de la administración oral de ooquistes, se realizó un estudio coprológico alterno siguiendo la misma metodología, en 10 perros residentes del establos del CAITSA en los cuales recientemente se había identificado abortos con lesiones asociadas a neosporosis. El objetivo de éste muestreo fue de identificar perros infectados en forma natural y que posiblemente estuvieran eliminando ooquistes del parásito para poderlos recolectar, purificar, someterlos a esporulación y de esta manera administrarlos por vía oral a los perros del presente estudio, siguiendo las indicaciones de Gondim et al (2002).

4.- ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados fueron procesados por medio de estadística descriptiva.

* Anestesal, Pfizer SA de CV. Salud Animal.

RESULTADOS

En todos los perros se encontraron endoparásitos. En el **cuadro 2** se indican los parásitos identificados. Para cestodos y nematodos se les administró prazicuantel más pamoato de pirantel y febantel¹, si solo presentaba nematodos fenbendazol² o nitroscanate³ y contra la coccidiosis se utilizó toltrazuril⁴. Todos ellos administrados según la dosis recomendada por el fabricante. Diariamente durante siete días se evaluaron con el fin de comprobar la ausencia de parásitos. A lo cual ningún perro resultó positivo a la presencia de ooquistes ni a anticuerpos anti- *N. caninum*.

1.- PRIMER MODELO

En el **cuadro 3** se muestran los datos de los abortos positivos a neosporosis. Con respecto a los 40 fetos de bovinos abortados de entre 7 a 8 meses, dos (5%) resultaron positivos y presentaron lesiones asociadas a neosporosis, (**figuras 1, 2**) Se realizaron las inoculaciones, una el 22 de septiembre y otra el 1 noviembre, las muestras se mantuvieron 14 días de almacenamiento en refrigeración para el primer caso y de 16 días para el segundo. Al evaluar diariamente, no se identificó por medio de exámenes coprológicos a ningún animal que estuviera eliminando ooquistes ni positivo a anticuerpos anti- *N. caninum* por medio de ELISA.

2.- SEGUNDO MODELO

En el **cuadro 4** se muestran los datos de los abortos positivos a neosporosis. De 42 fetos de bovinos abortados, analizados de diciembre 2004 a junio del 2005, tres (7.1%) fueron positivos a neosporosis observándose lesiones semejantes a las de

1 Drontal. Bayer de México SA de CV.

2 Panacur plus, Intervet México SA de CV. Av Paseo de los Frailes 22 Parque industrial Santiago Tianguistenco. Edo de México. 52600

3 Lopatol 100, Novartis Salud Animal SA de CV Cal de Tlalpan 3058 Col Santa Ursula Coapa. México DF, Tel 422-6359

4 Baycox 5%, Bayer de México SA de CV.

las **figuras 1 y 2**, de hecho, en uno de ellos se observaron quistes en cerebro (**figura 3**) sin embargo, los tres fetos fueron confirmados por QHI positivos a la presencia de quistes o taquizoitos de *N. caninum*. La administración de los fetos se dio el mismo día o a más tardar un día después. Al finalizar este modelo, no se identificó ningún perro que estuviera eliminando ooquistes de *N. caninum* por medio de los exámenes coprológicos o que resultara seropositivo a anticuerpos anti-*N. caninum* por medio de ELISA. En la evaluación histopatológica del intestino de los perros, no se observó evidencia del desarrollo de fases enteroepiteliales, lo cual fue confirmado por QHI.

3.- TERCER MODELO

En el **Cuadro 5** se muestran los datos de los dos becerros precalostrados positivos a anticuerpos anti-*N. caninum*. En la evaluación microscópica de los cerebros de estos becerros solo en uno de ellos se observó un foco de microgliosis, el cual se ilustra en la **figura 4**, en el otro becerro no se observaron lesiones microscópicas. Por medio de QHI ambos becerros fueron confirmados como positivos a la presencia de quistes o taquizoitos de *N. caninum* **figura 5 y 6**. No se identificó ningún perro positivo por medio de los exámenes coprológicos que estuviera eliminando ooquistes de morfología semejante a *N. caninum*. En la evaluación histopatológica que se hizo del intestino, no se observaron alteraciones, ni evidencia del desarrollo de fases enteroepiteliales, lo cual fue confirmado por medio de QHI.

En el **cuadro 6** se enlistan los hallazgos coprológicos en perros residentes de algunos establos del CAITSA. En éstos, solo se encontraron siete perros que eliminaban huevos de parásitos como *Ancylostoma spp*, *Toxocara spp* y proglotis de *Dipylidium spp*. Solo en uno de ellos se localizaron ooquistes, unos elípticos con forma semejante a una *Eimeria spp* de bovino y otros esféricos, éstos últimos midieron 6.1, 8 y 9.2 micras de diámetro y se determinó que probablemente correspondían a *Cryptosporidium spp*

DISCUSIÓN

La metodología en el primer modelo, particularmente para la recolección de las muestras de los fetos de bovino se apoyó en el informe previo de Lindsay et al., (1992) quien indicaba que los bradizoitos en los quistes pueden sobrevivir hasta 14 días a 4° C en un homogenizado de cerebro y estos también sobrevivieron en un cerebro intacto de un ratón a 4° C por 7 días. El CAITSA fue seleccionado como lugar del muestreo, debido a que se tienen antecedentes positivos a neosporosis. (Morales et al., 2001ab)

En los modelos 1 y 2, el haber encontrado 2 de 40 fetos (5 %) y 3 de 42 fetos (7.1%) con lesiones características de neosporosis, puede estar asociado con la edad ya que tenían de 7 a 8 meses de gestación y la mayoría de los informes de aborto bovino asociado a neosporosis, indican que la mayor frecuencia de abortos por esta infección ocurre entre los 4 y 6 meses de gestación (García et al., 2002; Anderson et al., 1995). La edad de los fetos se debió a que a menores edades era muy difícil su obtención o cuando esto ocurría los tejidos ya presentaban avanzada autólisis y por lo tanto menores condiciones de conservación. Posiblemente esta sea la razón por la cual la frecuencia de fetos con lesiones características de neosporosis fue menor (5/82, 6.09%) respecto a lo informado por Morales et al., (2001b) quienes encontraron en el CAITSA un 35 % (73/211) de abortos con lesiones y/o parásitos.

Los hallazgos histopatológicos y de QHI en los 5 abortos, indicaron lesiones leves y positividad a escasos quistes con bradizoitos y a taquizoitos, siendo un resultado similar a lo encontrado en el estudio de Morales et al., (2001b). Esto sugiere que la cantidad de parásitos presentes en los tejidos pudo haber sido baja. En los tres modelos se pretendió reproducir la infección en los perros sin hacer ningún manejo de los tejidos fetales o neonatales tal y como sucedería en una transmisión natural, salvo la refrigeración. Tampoco se utilizaron sustancias inmunosupresoras como en el estudio de Gondim et al., (2002) quienes obtuvieron

resultados positivos en la infección experimental de los perros, así como en el estudio de Lindsay et al., (1999a) quienes utilizaron inmunosupresores en perros antes y durante la infección obteniendo también resultados positivos.

El hecho de que en el modelo 1 los tejidos de los abortos que resultaron positivos a lesiones en el cerebro permanecieron almacenados en refrigeración por 14 y 16 días respectivamente, pudo haber influido para que los perros no se infectaran por la pérdida de viabilidad por la autólisis, disminuyendo la capacidad de infección de *N. caninum*, aunado a una posible dosis infectante baja. Este resultado es semejante a una investigación realizada por Bergeron et al., (2001b) en Canadá, en la cual obtuvieron resultados negativos como éstos, cuando para inducir la infección experimental de los perros administraron tejidos fetales de bovino que se almacenaron a -70° C por 4 a 28 días en un primer experimento y a 4° C por 2 a 4 semanas en un segundo experimento. Sin embargo, existen otros estudios en los cuales han demostrado infección cuando los perros consumen placentas refrigeradas (Dijkstra et al., 2001; Bergeron et al., 2001a; Dijkstra et al., 2002). En esta investigación solo pudieron recolectarse dos placentas que junto con los tejidos fetales fueron negativos a lesiones por histopatología. Por lo cual no pudieron ser utilizadas como alimento.

Los resultados del primer modelo conllevaron a la propuesta del segundo modelo: que favoreció que los tejidos pudieran ser administrados a más tardar un día después. Posiblemente la causa de pocos casos positivos (3/42, 7.1 %) es semejante a lo planteado para el primer modelo ya que los fetos fueron mayores a los 6 meses de gestación.

Dada la cantidad de muestras que se tenían que administrar a los perros, en algunas ocasiones se decidió dar 3 o 4 muestras por perro, cabe destacar que durante los meses de abril y mayo del 2005 el número de muestras disponibles se redujo debido a las condiciones climáticas de calor que provocaba una pronta autólisis de los abortos.

Con este cambio en la recolección de las muestras se redujo el tiempo de almacenamiento esperando conservar la viabilidad de los parásitos. Propuesta como esta también fue realizada por Bergeron et al., (2001b), sin embargo, sus resultados igualmente fueron negativos a la infección de los perros. La recolección y refrigeración inmediata del aborto hubiese sido lo ideal, no obstante dado que es un evento que no se anticipa los fetos quedan expuestos a la temperatura ambiental durante varias horas antes de su recolección, provocando su autólisis.

Al respecto, en condiciones naturales se esperaría que los perros puedan tener acceso a fetos recién abortados, lo cual facilitaría la infección y continuidad del ciclo biológico de *N. caninum* (Bergeron et al., 2001b). Además, poco se conoce sobre la edad, raza o condiciones inmunológicas que favorezcan la susceptibilidad para adquirir la neosporosis (Lindsay et al., 1999). En experimentos realizados con ratones, para tener éxito en la infección, se les administraron corticoesteroides para inducir inmunosupresión y así asegurar la infección (McAllister et al., 1998). Lo mismo sucedió con un perro inoculado por Lindsay et al., (1999) que además produjo abundantes ooquistes por un largo periodo, a diferencia de otro perro que no fue inmunosuprimido el cual produjo pocos ooquistes en solo 4 días.

Como ya se indicó, si bien no hay informes que indiquen con precisión la edad de los perros a la que son más susceptibles. Sin embargo, en investigaciones previas, como en el primer informe de infección experimental en perros, realizado por McAllister et al., (1998) se utilizaron 4 perros Beagle de 8 semanas de edad. En otro estudio realizado por Lindsay et al., (1999) para la confirmación del trabajo anterior se usaron 2 perros (hembra y macho) de 14 semanas de edad obteniéndose resultados positivos. En otra investigación se usaron 12 perros de 7 a 11 semanas, uno de los perros se mantuvo en experimentación hasta la edad de 17 semanas, pero no hubo infección (Bergeron et al., 2001). Otros 15 cachorros entre 10 y 14 semanas de edad se utilizaron por Gondim et al., (2002) en este experimento se determinó la diferencia en la cantidad de ooquistes producidos

cuando los perros son infectados a partir de tejidos positivos a *N caninum* de ratones o de bovinos y se observó un periodo de prepatencia de 5 a 10 días.

En el tercer modelo, con el cual se pretendió obtener muestras de becerros naturalmente infectados, y administrados de manera inmediata a su muerte, difirió del trabajo de Gondim et al., (2002) en el cual se utilizaron los tejidos infectados intencionalmente con diferentes dosis de ooquistes y taquizoitos, que fueron almacenados en refrigeración 24 horas antes de la inoculación de los perros. En ese estudio si se logró la infección en los perros.

La cantidad de tejidos de becerros positivos que se les administró a los cachorros fue menor (600 gr) con respecto a los 3 kg que recibieron los perros inoculados por Gondim et al., (2002) que incluían cerebro, médula espinal, corazón, hígado, riñón, lengua, diafragma y otros músculos esqueléticos que se cortaron en piezas de 3 cm³ y que lograron infectar a los perros.

En este tercer modelo se garantizó una inmediata administración de tejidos potencialmente infectivos, reduciendo el tiempo, con respecto a los otros modelos realizados en esta investigación, ya que solo pasaron minutos desde el sacrificio de los becerros hasta el consumo por los perros. Aún así, no se logró la infección en los perros a pesar de que la muestra de un becerro presentó escasos focos de respuesta inflamatoria en cerebro y por medio de QHI se observaron escasos grupos de taquizoitos y algunos quistes mientras que en el otro becerro no se observaron lesiones pero si se identificaron escasos taquizoitos por QHI.

Estos hallazgos, hacen pensar que la dosis infectante fue mínima. Al respecto. La ausencia de lesiones en los fetos de vacas seropositivas a neosporosis puede ser debido a factores como una baja dosis infectiva y a evasión de la respuesta inmune del huésped, entre otros. (Morales et al., 2001, Bergeron, et al., 2001b). En estos casos se sugiere analizar mayor número de muestras de los mismos tejidos. Posiblemente si existen pocos quistes tisulares y/o taquizoitos en los

cerebros con los que se alimentan a los perros en los experimentos, también será baja la eliminación de ooquistes detectable en heces (McAllister et al., 1998) lo que pudo ocurrir en el presente estudio.

Si bien, con este modelo se tuvo el control de algunas variables cruciales como el tiempo y la temperatura que pudieran favorecer la viabilidad de los parásitos, no se tuvo control de la dosis infectante. En estudios futuros se propone obtener más becerros precalostrados seropositivos para separar, concentrar y cuantificar los quistes tisulares con bradizoitos a través de la metodología propuesta por McGuire et al., (1997) y probablemente tener mayores posibilidades en la infección. Sin una cuantificación de los quistes tisulares en el alimento con el que se inocula, los resultados serán difícilmente creíbles (McAllister et al., 1998).

No se conoce con precisión, los factores que afectan la viabilidad de los parásitos en los tejidos fetales o placentarios, tanto en condiciones de temperatura medioambiental como en refrigeración. Para inducir la infección en los perros este conocimiento es necesario, para ello deben realizarse más investigaciones al respecto.

Con relación al muestreo coprológico realizado en los perros de CAITSA los ooquistes con morfología compatible a *Eimeria* de bovino encontrados en un animal, probablemente solo estaban de tránsito por contaminación del alimento. Otros ooquistes esféricos fueron muy escasos, fueron consistentes con *Cryptosporidium*. Debido a la poca cantidad de ooquistes, no se contempló realizar PCR para confirmar que correspondían a ooquistes de *N. caninum*. El muestreo se suspendió debido a lo incierto en la eliminación de los ooquistes y las pequeñas cantidades que se obtuvieron.

A pesar de haberse empleado tres modelos para reproducir la enfermedad en los perros, con ninguno fue posible lograrlo. Lo anterior sugiere que se requieren de condiciones especiales para que la transmisión horizontal se presente, y como

lo ha señalado Dubey, (2003a) esta no es una fuente importante de infección en los perros. Lo que consolida la hipótesis de que la transmisión vertical tanto en perros como en bovinos es la de mayor importancia (Antony y Williamson, 2001).

Una vez que los bovinos han adquirido a la neosporosis, la magnitud de esta enfermedad radica en los efectos económicos causados por el aborto (Anderson et al., 1995) ya que clínicamente los animales no exhiben otro signo (Dubey, 2003b). En los perros, aún cuando el aborto no es frecuente, (Dubey y Lindsay, 1996) las camadas de cachorros padecen manifestaciones clínicas neurológicas que pueden terminar en la muerte (Barber y Trees, 1996; Dubey y Lindsay, 1996). Mientras no se conozca un tratamiento eficaz el control se ve limitado (Dubey, 2003a).

Aún cuando en condiciones experimentales se ha demostrado la capacidad infectiva de las placentas y los tejidos fetales bovinos a los perros (Dijkstra et al., 2001; Bergeron et al., 2001a; Dijkstra et al., 2002) no se ha logrado precisar con exactitud dichas condiciones, por ello es necesario implementar medidas de prevención, como evitar el consumo de los tejidos fetales o placentarios a los perros (Dubey, 2003a), esto se logra manteniendo a los perros del establo en confinamiento parcial o total y alimentándolos únicamente con alimento comercial. En caso de querer utilizar fetos como alimento, estos deben ser hervidos lo suficiente para eliminar los posibles patógenos.

En algunos establos se dispone de un área especial para el parto, es un sitio aislado del resto de los animales y puede ser debidamente cercado con malla. El problema es que de presentarse el aborto no siempre es posible anticiparlo y los animales lo expulsan en los corrales, por lo tanto los corrales o todo el establo debe contar con un cerco perimetral de modo que impidan el acceso de perros .

Debido a los problemas sanitarios por brucelosis, el CAITSA cuenta con un sistema de recolección de desechos, entre los que se encuentran los tejidos infectocontagiosos como placentas y abortos. Dichos materiales son empacados en bolsas de colores que permiten su identificación y se eliminan por medio de incineración o reciclamiento, por una empresa contratada para ello. Este sistema permite disminuir la cantidad de tejidos disponibles a los perros

En esta investigación se observó que la capacidad infectiva de los parásitos pudo haberse disminuido por efecto de este sistema de recolección. Esto debe ser emulado por otros establos.

También debe evitarse que los perros contaminen con su excremento el agua o los alimentos de los bovinos como el forraje ensilado o la alfalfa henificada en los almacenes o en los comederos, ya que en caso de eliminar ooquistes de *N caninum* estos pueden infectar al ganado (Cabassi et al., 2001b). Poco se conoce sobre la frecuencia de excreción de ooquistes por los perros la resistencia de los ooquistes en el medio ambiente y el por que algunos perros excretan mas ooquistes que otros (Dubey, 2003a). Aún no se conocen las condiciones de temperatura y humedad que se requieren en condiciones naturales para favorecer la esporulación de los ooquistes. Aunque en condiciones de laboratorio ya se tienen datos (Gondim et al., 2002).

El uso de vacunas esta siendo recomendado para reducir la transmisión de parásitos de la vaca a las crías (Innes et al., 2003). Sin embargo, no es claro el efecto protector al desconocerse los mecanismos reales de transmisión, así como su prevalencia y otras variables.

Es importante conocer el estado serológico del hato ante esta enfermedad, debido a que si bien la presencia de anticuerpos anti-*N caninum* en los animales no necesariamente indica que se presentarán abortos, se entiende que las vacas

ya han tenido contacto con el parásito y por lo tanto estarán en mayor riesgo de abortar. El siguiente paso es estudiar a los abortos para confirmar la presencia de infección. En caso de que no existiera evidencia de neosporosis en el hato, deberán adquirirse animales de reemplazo serológicamente negativos, a fin de mantener el rebaño libre, además, aún en caso de positividad hay que descartar otras posibles causas.

La información sobre la neosporosis con la que cuenten el dueño, los clínicos y el personal que labora en los establos, es muy importante para que las medidas de prevención de esta parasitosis tengan éxito. Esto requiere la elaboración de folletos, artículos en revistas dirigidas hacia el sector ganadero, foros y congresos entre otras actividades.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de estos modelos, se concluye que:

La frecuencia de lesiones en el cerebro asociados a neosporosis en abortos de 7 a 8 meses de gestación fue del 6.09 % (5/82).

Los modelos utilizados en esta investigación no lograron la infección experimental de los perros con *N caninum*.

Algunas variables como el tiempo y la temperatura a la que se expusieron los abortos desde su expulsión hasta su refrigeración, así como el tiempo de almacenamiento de los tejidos fetales, pudieron haber influido en la viabilidad de los bradizoitos y taquizoitos, además de que la cantidad de parásitos presente en los tejidos administrados a los perros pudo haber sido baja. Posiblemente se hubiera tenido éxito en la infección de los perros si se les hubieran alimentado con placentas infectadas.

Por lo que se infiere, que para que se desarrolle la vía horizontal de transmisión de la neosporosis entre bovino y perro, se requieren de condiciones naturales muy específicas aún no establecidas. Sin embargo, se sugiere tener control sobre los perros para que no tengan acceso a tejidos placentarios o fetales bovinos potencialmente infectivos, así como evitar que se contamine el agua y los alimentos con heces de los perros.

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez MJA, Figueroa MJV, Rojas MC, Tapia GD (2004). Detección de *Neospora caninum* en fetos abortados mediante PCR. XXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas de Bovinos Asociación Civil, 18-20 agosto 2004, Morelia, Michoacán, México.
- Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, Read DH, , Dubey JP, Conrad PA., Barr BC. (1995) Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 207: 1206-1210
- Anthony, A. and Williamson, N. B. (2001) Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. *New Zealand Veterinary Journal*. **49**: (2) 42-47.
- Anthony, A. and Williamson, N.B (2003) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. **51** (5) 232-237
- Barber JS, Payne-Johnson CE, and Trees AJ. (1996). Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *Journal Small Animal Practice*, 37: 568-574.
- Barber J. Trees AJ: (1996) Clinical aspects of 27 cases of neosporosis on dogs. *Veterinary Record*. **139**: 439-443
- Barber J. Gasser RB. Ellis J. Reichel MP. McMillan D. I. Trees AJ: (1997a) Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *The Journal of Parasitology* .**83**: 1056-1058
- Barber J. van Ham L. Polis I. Trees AJ: (1997b) Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. *Journal Small Animal Practice* .**38**: 15-16
- Basso, W. Venturini, L. Venturini, M.C. Moore, P. Rambeau, M. Unzaga, J.M. Campero, C. Bacigalupe, D. Dubey, J.P. (2001b) Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *The Journal of Parasitology*. **87** (4) p. 906-907
- Bergeron, N. Girard, C. Pare, J. Fecteau, G. Robinson, J. Baillargeon, P. (2001a) Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **13**: 2, 173-175.
- Bergeron, N. Fecteau, G. Villeneuve, A. Girard, C. Pare, J. (2001b) Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. **97**: 2, 145-152
- Björkman C, Lundén A, Holmdahl OJM, Barber J, Trees A.J. and Uggla A. (1994). *Neospora caninum* in dogs. Detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*, 16: 643-648.
- Cabassi, C. S. Taddei, S. Galvani, G. Cavirani, S. (2001a) *Neospora caninum*: a serological survey on antibody prevalence in dairy cattle herds with or without dogs. *Obiettivi e Documenti Veterinari*. 2001. **22**: 3, 43-46.

- Cabassi, C. S. Taddei, S. Cavarani, S. Ferri, S. Chieli, L. Barbieri, M. (2001b) *Neospora caninum*: a serological survey to antibody prevalence in urban or farm dogs. *Obiettivi e Documenti Veterinari*. **22**: 3, 69-72.
- Coskun, SZ. Aydyn, L. Bauer, C. (2000) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in domestic dogs in Turkey. *Veterinary Record* **146**: 649-649
- Cringoli G, Capuano F, Veneziano V, Romano L. Solimene R. Barber J. Trees AJ (1996) Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dog sera. *Parassitologia*. **38**: 282
- Cringoli G, Rinaldi E, Capuano F, Baldi L Veneziano V, Capella G (2002) Serological survey of *Neospora caninum* and *Leishmania infantum* co-infection in dog. *Veterinary Parasitology* **106**: 307-313
- Dijkstra, T. Eysker, M. Schares, G. Conraths, F. J. Wouda, W. Barkema, H. W. (2001) Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*. **31**: 8, 747-752
- Dijkstra, T. Barkema, H. W. Eysker, M. Hesselink, J. W. Wouda, W. (2002). Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Veterinary Parasitology*. **105**: 2, 99-104
- Dubey, JP, Carpenter, JL. Speer, CA. Topper, MJ. Uggla, A. (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **192**: 1269-1285
- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS and Topper MJ. (1988b). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **193**: 1259-1263.
- Dubey, JP, Lindsay, DS. (1996) A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology* **67**: 1-59
- Dubey, J. P. Dorrough KR. Jenkins, M. C, et al. (1998) Canine neosporosis : clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *International Journal for Parasitology* **28**: 1293-1304
- Dubey JP (1999a). Neosporosis-the first decade of research. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1485-1488.
- Dubey JP. (1999b). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, **84**: 349-367
- Dubey, JP, Lindsay, DS. (2000) Gerbils (*Meriones unguiculatus*) are highly susceptible to oral infection with *Neospora caninum* oocyst. *Parasitology* **86**: 165-168
- Dubey, J. P. Barr, B. C. Barta, J. R. Bjerkas, I. Bjorkman, C. Blagburn, B. L. Bowman, D. D. Buxton, D. Ellis, J. T. Gottstein, B. Hemphill, A. Hill, D. E. Howe, D. K. Jenkins, M. C. Kobayashi, Y. Koudela, B. Marsh, A. E. Mattsson, J. G. McAllister, M. M. Modry, D. Omata, Y. Sibley, L. D. Speer, C. A. Trees, A. J. Uggla, A. Upton, S. J. (et al).(2002) Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*. **32**: 8, 929-946.
- Dubey, JP. (2003a) Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology* **41** (1) 1-16

- Dubey JP. (2003b). Neosporosis in cattle. *The Journal of Parasitology (Suppl)*, 89: S42-S56.
- El-Gaysh, A; Khalil, F; Hilali, M, Nassar, AM. (2003) Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection in some domestical animal from Egypt. *Veterinary Medical Journal Giza*. **51** (3) 355-361
- French NP, Clancy D, Davison HC, and Trees AJ. (1999). Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: Transmission and options for control. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1691-1704.
- García VZ, Cruz VC, Medina EL, García TD, Chavarria MB. (2002). Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*, **106**: 115-120.
- Garcia VZ, Rosario CR, Ramos AA,. Cruz VC, Mapes SG. (2005) *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Veterinary Parasitology*. **134** 61–65
- Gennari, S. M. Yai, L. E. O. D'Auria, S. N. R. Cardoso, S. M. S. Kwok, O. C. H. Jenkins, M. C. Dubey, J. P. (2002) Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*. **106**: 2, 177-179
- Gondim, L.F.P. Gao, L. McAllister, M.M.(2002) Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *The Journal of Parasitology*. **88** (6) p. 1159-1163.
- Gondim, L.F.P, McAllister, M.M. Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME.(2004) Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *The Journal of Parasitology*. **90** (6) p. 1361-1365
- Gondim, L.F.P, McAllister, M.M. Pitt WC, Zemilcka DE (2004) Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. **34**: 159-161
- Hay WH, Shell L, Lindsay DS, and Dubey JP. (1990). Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **197**: 87-88.
- Hill, DE. Liddell, S. Jenkins, MC. Dubey, JP. (2001) Specific detection of *Neospora caninum* oocyst in fecal samples from experimentally-dogs using the polymerase chain reaction. *The Journal of Parasitology*. **86**: 395-398
- Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Barrtley P, Hamilton C, Carey IM, and Buxton S. (2001). Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology*, **31**: 1523-1534.
- Innes EA, Andrianarivo AG, Bjorkman C, Williams DJL, and Conrad PA. (2002). Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitology*, **18**: 497-504.
- Jacobo LNE (2003). Determinación de la presencia de anticuerpos de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del Distrito de Desarrollo Rural # 148, Cajeme. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora
- Klein BU. Muller E. (2001) Seropravalenz von antikörpern gegen *Neospora caninum* bei hunden mit und ohne klinischem Neosporoseverdacht in Deutschland. *Der praktische Tierarzt* **82**: 437-440

- Kramer, L. Risio, L. Tranquillo, VM. Magnino, S. Genchi, C. (2004) Analysis of risk factors associated with seropositivity to *Neospora caninum* in dogs. *Veterinary Record* **154** (22) 692-693
- Larsi S, Meerschman F, De Rettinger, C, Focant C, Losson B, (2004) Comparison of three Techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Veterinary Parasitology* **123**: 25-32
- Lindsay, DS. Blagburn BL, Dubey, JP (1992) Factors affecting the survival of *Neospora caninum* in murine tissues. *The Journal of Parasitology* **78**: 70-72
- Lindsay, DS. Dubey, JP, Duncan RB (1999a) Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* **82**: 327-333
- Lindsay, DS. Upton SJ. Dubey, JP. (1999b). A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *International Journal for Parasitology*, **29**: 1521-1523
- Lindsay DS and Dubey, J.P. (2000). Canine neosporosis. *Journal Veterinary Parasitology*, **14**: 1-11.
- Lindsay DS, Ritter DM. Brake D.. (2001). Oocyst excretion in dog fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology* **87**: 909-911
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. (1988) Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. **28**: 1473- 1478
- McGarry JW, Stockton DJL, Williams DJL Trees AJ, (2003). Protracted Shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *The Journal of Parasitology* **89**: (3) 628-630
- McGuire AM, McAllister MM, Jolley WR. (1997). Separation y criopreservación of *Neospora caninum* Tissue cysts from Murine Brain. *The Journal of Parasitology*. **83** (2) 319-321
- Mineo TWP, Silva DAO, Costa GHN, et al. (2001) Detection of IgG antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. *Veterinary Parasitology*. **98**: 239-245
- Morales SE, Ramírez LJ, Trigo TF, Ibarra VF, Puente CE, y Santacruz M. (1997). Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora sp* en México. *Veterinaria México*, **28**: 353-357.
- Morales SE, Trigo TFJ, Ibarra VF, Puente CE, Santacruz M (2001a). Seroprevalence study of bovine neosporosis in México. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **13**: 413-415.
- Morales E, Trigo FJ, Ibarra F, Puente E, Santacruz M. (2001b). Neosporosis in Mexican Dairy Herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *Journal Comparative Pathology*, **125**: 58-63.
- Patitucci, A. N. Perez, M. J. Rozas, M. A. Israel, K. F. (2001) Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. **33**: 2, 227-232
- Peters, M. Lutkefels, E. Heckerroth, A.R. Schares, G.(2001) Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*. **31** (10) p. 1144-1148.

- Pipano E, Shkap V, Fish L, Savitsky I, Perl S, Orgad U. (2002) Susceptibility of *Psammomys obesus* and *Meriones tristami* to tachyzoites of *Neospora caninum*. *The Journal of Parasitology* **88**: 314-319
- Reichei MP, Thorton RN, Morgan PI, Mills RJM, Schares G. (1998) Neoporosis in a Pup. *New Zealand Veterinary Journal* **46**: 106-110
- Rodrigues AAR, Genari SM, Aguilar DM, Sreekumar C, Hill DE, Miska KB, Vianna MCB, Dubey JP. (2004). Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*. **124**:139-150
- Romand S, Thulliez P and Dubey JP, (1998). Direct Agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research*, **60**: 50-53.
- Ruehlmann D, Podell M, Oglesbee M, and Dubey JP. (1995). Canine neosporosis: A case report and literature review. *Journal American Animal Hospital Association*, **31**: 174-183.
- Sanchez, G. F. Morales, S. E. Martinez, M. J. Trigo, J. F. (2003) Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*. **67**: 2, 142-145.
- Sawada M, Prk CH, Kondo H. Et al. (2000) Isolation of *Neospora caninum* in japanes dogs. *Journal Veterinary Medical Science* **60**: 853-854
- Schares G, Heydorn AO, Cuppers A, Conraths FJ, and Mehlhorn H. (2001). *Hammondia heydorni*-like oocyst shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. *Parasitology Research*, **87**: 808-816.
- Schares, G. Pantchev N. Barutzki , D Heydorn , A.O.. Bauer C., Conraths F.J (2005). Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *International Journal for Parasitology* (article in press) (2005) 1–13
- Slapeta JR, Modry D, Kyselova I, Horejs R, Lukes J, Koudela B. (2002) Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenic approach. *Veterinary Parasitology* **109**: 157-167
- Souza, S.L.P. de. Guimaraes, J.S. Jr. Ferreira, F. Dubey, J.P. Gennari, S.M. (2002) Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. *The Journal of Parasitology*. **88** (2) p. 408-409.
- Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, Williams DJL. (2002). *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Veterinary Parasitology* **109**: 147-154
- Thurmond MC, and Hietala SK. (1995). Strategies to control *Neospora* infection in cattle, *Bovine Practice*, **29**: 60-63.
- Thurmond MC, and Hietala SK. (1996). Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *American Journal Veterinary Research*, **57**: 1559-62.
- Williams, D. J. L. Davison, H. C. Helmick, B. McGarry, J. Guy, F. Otter, A. Trees, A. J. (1999). Evaluation of a commercial ELISA for detecting serum antibody to *Neospora caninum* in cattle. *Veterinary Record*. **145**: 20, 571-575
- Wouda, W. Dijkstra, T. Kramer, A.M.H. Maanen, C. Brinkhof, J.M.A. (1999) Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*. **29** (10) p. 1677-1682

CUADROS

Cuadro 2. Endoparásitos identificados en los perros utilizados en los tres modelos.

Utilizados en el modelo	Perro	Edad en semanas	Endoparásitos*
1- 2	1	4	<i>Toxocara, Ancylostoma</i>
1- 2	2	4	<i>Isospora, Ancylostoma</i>
1- 2	3	4	<i>Isospora, Ancylostoma</i>
2	4	12	<i>Isospora, Dipylidium</i>
2	5	12	<i>Toxocara, Ancylostoma</i>
2	6	12	<i>Toxocara Isospora,</i>
2	7	4	<i>Isospora</i>
2	8	4	<i>Isospora</i>
2	9	4	<i>Isospora</i>
3	10	4	negativo
3	11	4	negativo
3	12	4	<i>Isospora</i>

* Huevos y ooquistes de los parásitos

Cuadro 3. Características de los dos abortos positivos a lesiones en el cerebro por *N. caninum* del primer modelo

Número Inóculo	Establo Origen	Días de Almacén	hallazgos por histopatología	Severidad	QIH	Edad* perros
1	122	14	focos microgliosis	leve	+ QT	11
2	122	16	focos microgliosis	leve	+ T	17

QIH: Inmunohistoquímica, resultados del cerebro

* Edad en semanas

+ Positivo

Q quistes intracelulares

T taquizoitos

Cuadro 4. Características de los tres abortos positivos a lesiones en cerebro por *N caninum* del segundo modelo

Número Inóculo	Establo Origen	Días de Almacén	Hallazgos por histopatología	Severidad	QHI	Edad* perros
1	196	2	focos microgliosis	leve	+T	33
2	197	2	focos microgliosis	leve	+QT	25
3	101	1	Quistes en cerebro	leve	+QT	22

QHI: Inmunohistoquímica, resultados del cerebro

* Edad en semanas

+ Positivo

Q quistes intracelulares

T taquizoitos

Cuadro 5. Características de los dos becerros precalostrados positivos a anticuerpos anti-*N caninum* del tercer modelo

Número Inóculo	Establo Origen	Tiempo de inóculo	Hallazgos por histopatología	Severidad	QHI	Edad* perros
1	146	1 hora	foco microgliosis	leve	+Q	8
1	163	1 hora	sin lesiones		+T	

QHI: Inmunohistoquímica, resultados del cerebro

* Edad en semanas

+ Positivo

Q quistes intracelulares

T taquizoitos

Cuadro 6. Hallazgos coprológicos en 10 perros residentes del CAITSA.

Nombre del perro	Establo origen	Edad	Hallazgos coprológicos*
Gladis	122	2 a	<i>Ancylostoma</i>
Sisi	122	2 a	<i>Ancylostoma</i>
Pastora	122	5 a	-
Ronda	171	7 a	Ooquistes <i>Ancylostoma</i>
Canica	171	4 m	<i>Toxocara</i>
Micha	171	4 a	-
Osito	101	1 a	-
Laica	101	9 m	<i>Ancylostoma</i>
Chiquita	101	10 m	<i>Ancylostoma</i>
Negro	101	1.5 a	<i>Dipylidium</i>

Edad a: años m: meses

* huevos de los parásitos

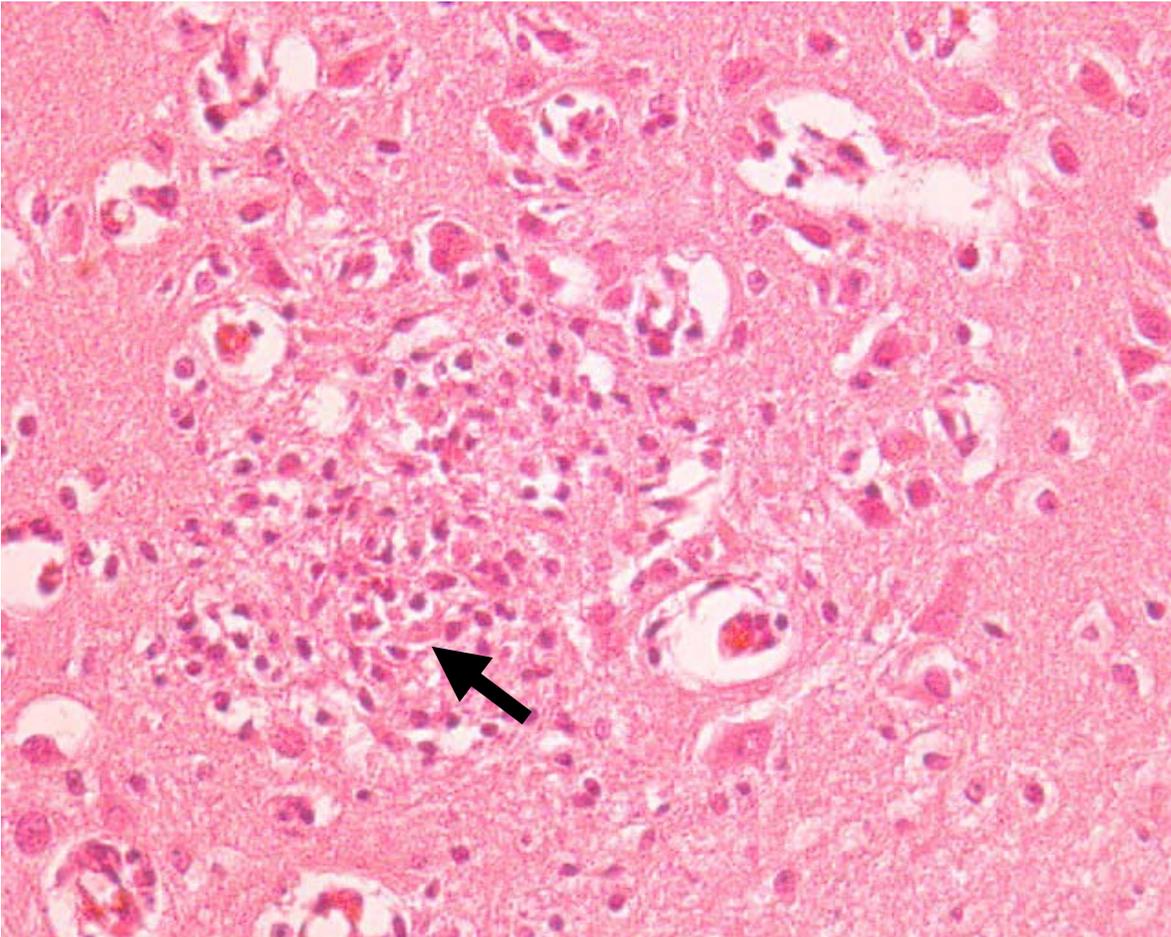


FIGURA 1. Fotomicrografía del cerebro de un aborto del primer modelo. La flecha indica el foco de microgliosis. H/E 400X.

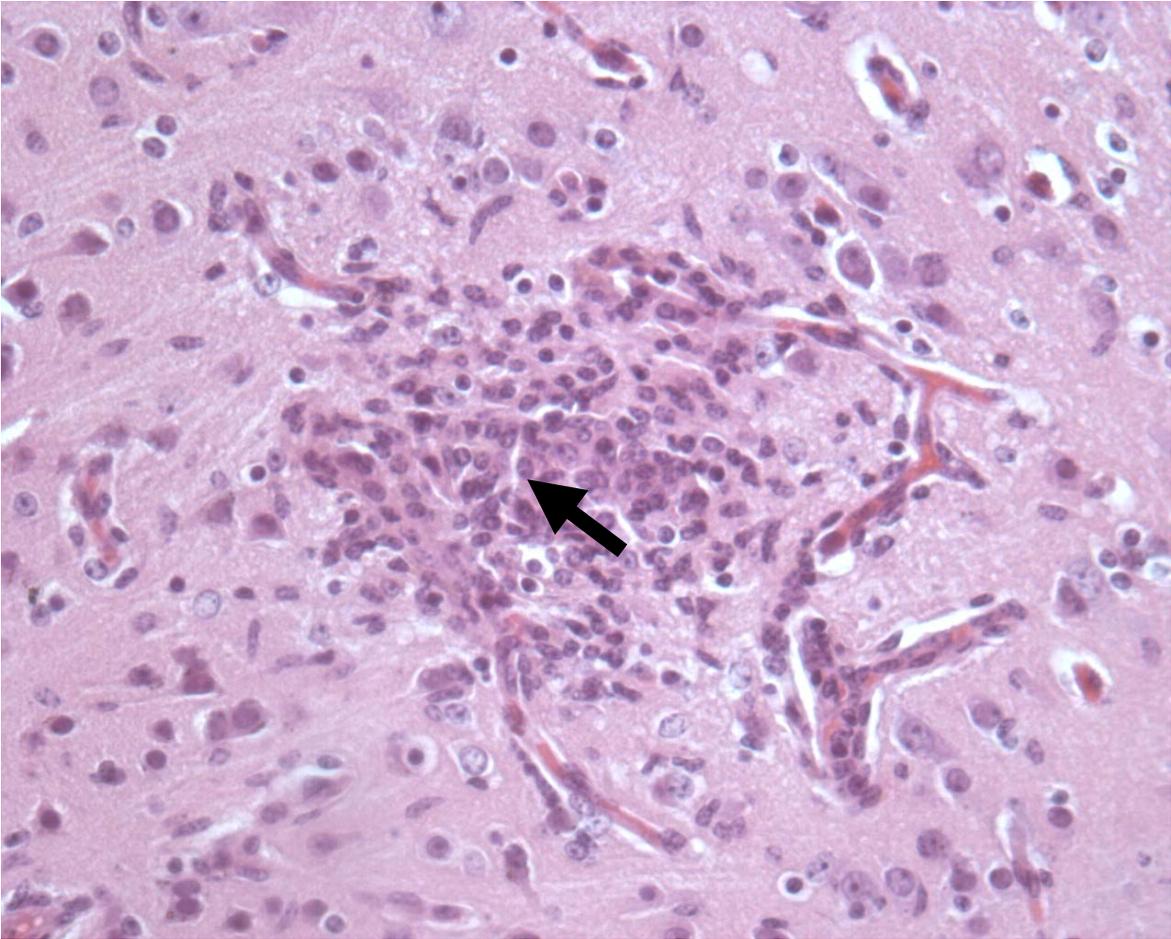


FIGURA 2 Fotomicrografía del cerebro de un aborto del primer modelo. La flecha indica el foco de microgliosis. H/E 400x.

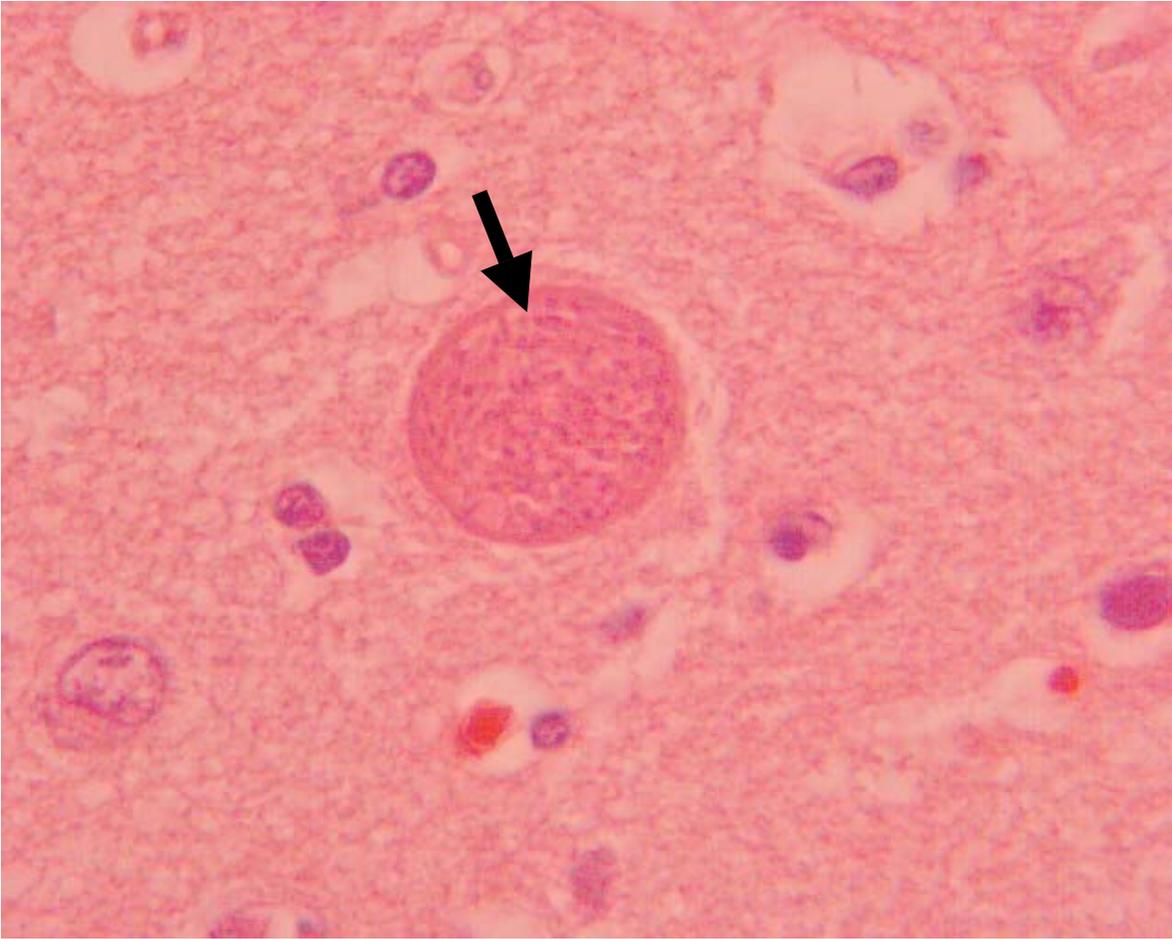


FIGURA 3 Fotomicrografía del cerebro de un aborto del segundo modelo. La flecha señala el quiste tisular de pared gruesa, nótese la ausencia de reacción inflamatoria. H/E 1000x.

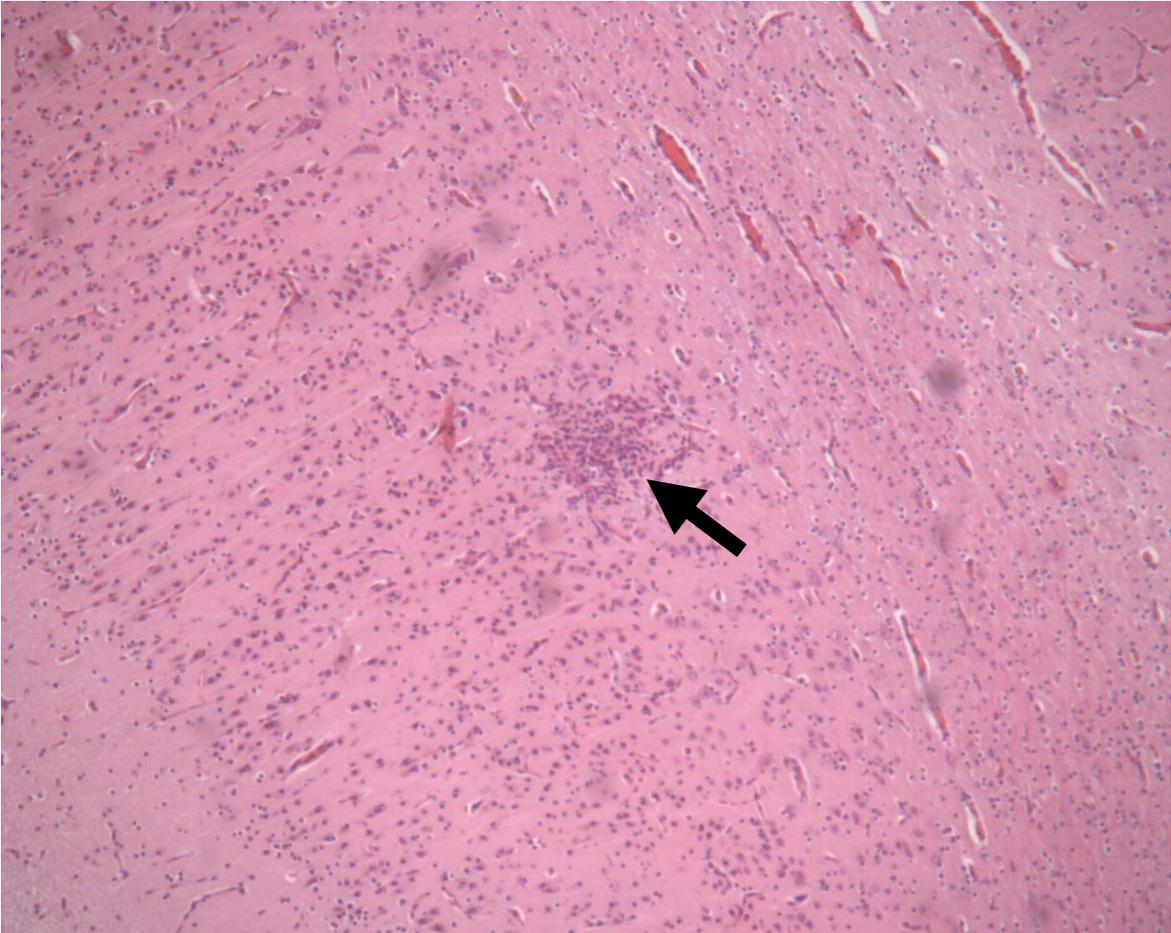


FIGURA 4 Fotomicrografía del cerebro de un neonato precalostrado positivo a anticuerpos anti- *N caninum* del tercer modelo. La fleche indica el foco de microgliosis en la corteza cerebral. H/E. 100 X

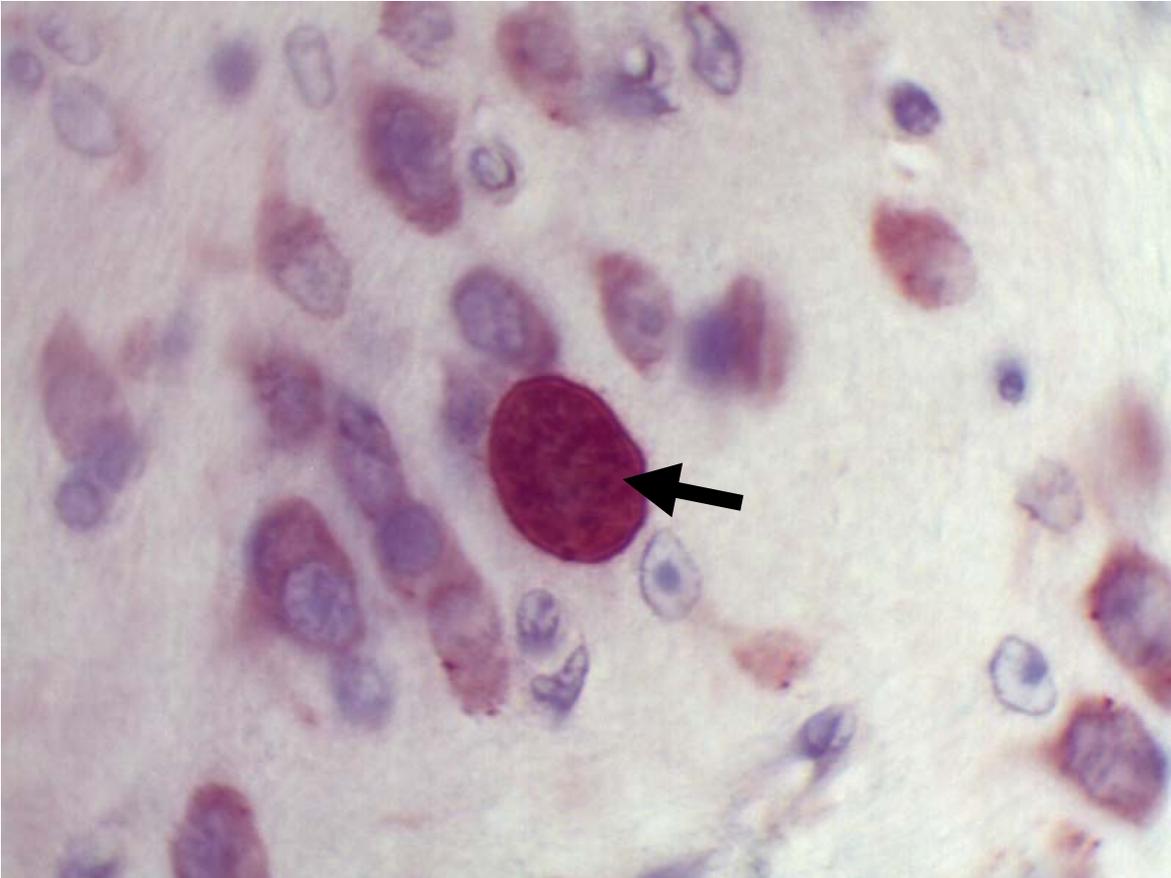


FIGURA 5 Fotomicrografía del cerebro de un neonato precalostrado positivo a anticuerpos anti- *N. caninum* del tercer modelo. La flecha indica el quiste tisular presente en la corteza cerebral. QHI 1000 X (Elizabeth Morales S)

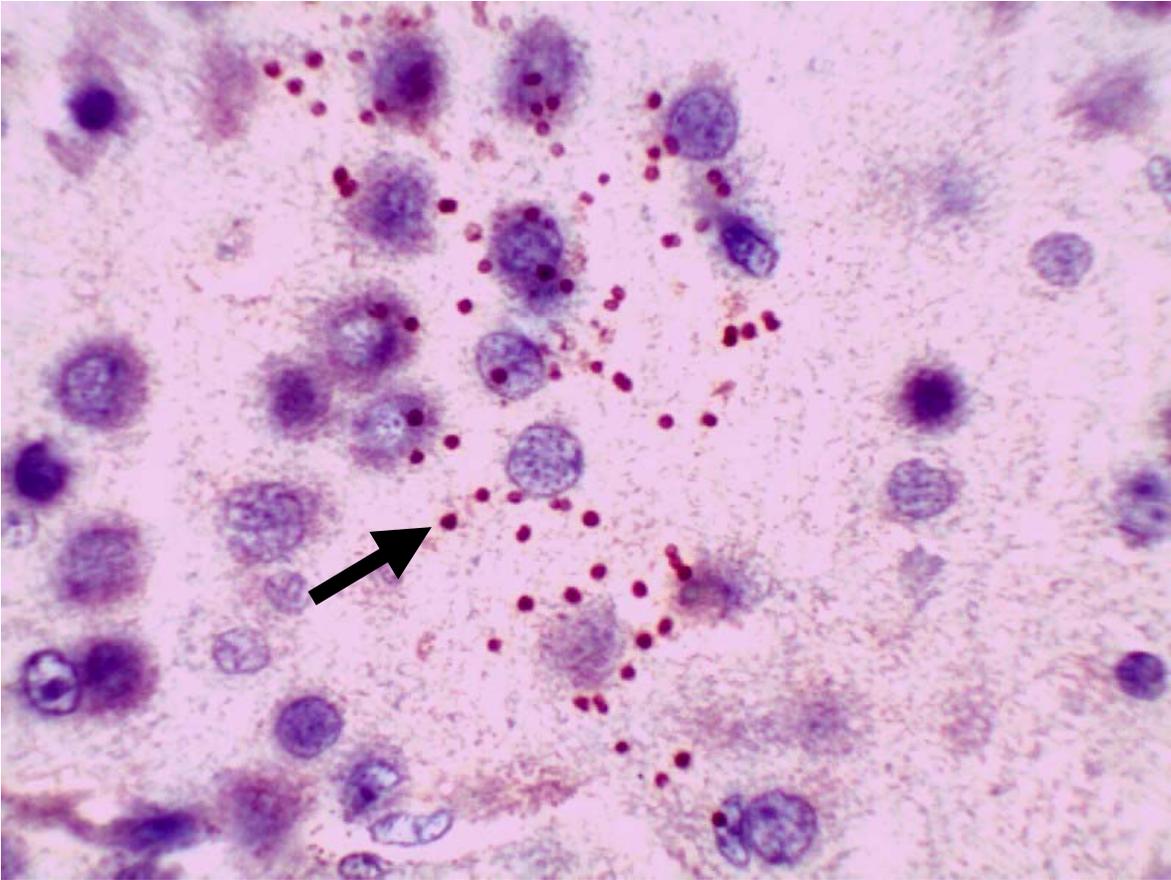


FIGURA 6 Fotomicrografía del cerebro de un neonato precalostrado positivo a anticuerpos anti- *N caninum* del tercer modelo. La flecha señala uno de tantos tachizoitos en la corteza cerebral. QHI. 1000 X (Elizabeth Morales S)