



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora*
caninum EN GANADO DE DOBLE PROPÓSITO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:
DELMAN FLORES ARRIAGA

ASESOR: **Dr. JOSÉ FRANCISCO MORALES ÁLVAREZ**



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.

ÍNDICE

	RESUMEN	1
I.	INTRODUCCIÓN	2
	2.1 Importancia económica	2
	2.2 Etiología	4
	2.3 Fases del parásito	6
	2.4 Patogenia	8
	2.5 Signos clínicos	9
	2.6 Respuesta inmune	10
	2.7 Mecanismo de transmisión	13
	2.8 Historia en México	16
	2.9 Prevalencia de la enfermedad en México	17
II.	JUSTIFICACIÓN	18
III.	OBJETIVOS	19
IV.	HIPÓTESIS	20
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	21
	5.1 Lugar de trabajo	21
	5.2 Selección de hatos	21
	5.3 Metodología general de campo	21
	5.4 Prueba serológica	22
VI.	RESULTADOS	24
VII.	DISCUSIÓN	35
VIII.	CONCLUSIONES	38
IX.	LITERATURA CITADA	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>N. caninum</i>	7
Figura 2	Fotomicrografías de estadíos de <i>N. caninum</i>	8
Figura 3	Propuesta del ciclo de vida de <i>N. caninum</i>	15
Figura 4	Distribución de las muestras trabajadas y sueros positivos, en los estados de Tamaulipas, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Guerrero.	27
Figura 5	Distribución de la seroprevalencia en los estados de Tamaulipas, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Guerrero.	27
Figura 6	Mapa del estado de Guerrero. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de <i>Neospora caninum</i> con ELISA Indirecta los municipios de Copala, Tlapehuala, Pungarabato, Tixtla de Guerrero, Coyuca de Benítez, Benito Juárez, José Azueta, Tecpan y Tlalchapa.	28
Figura 7	Mapa del estado de Oaxaca. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de <i>Neospora caninum</i> con ELISA Indirecta los municipios de San Pedro Tapanatepec, Santiago Llano Grande, Ocotlan de Morelos, San Pablo Cuatro Venados, Loma Bonita, Chahuities, Matías Romero Avendaño, Santa María Colotepec y Santa María Chilchotla.	31
Figura 8	Mapa del estado de Tamaulipas. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de <i>Neospora caninum</i> con ELISA Indirecta los municipios de Aldama y Mante.	34
Figura 9	Mapa del estado de Tabasco. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de <i>Neospora caninum</i> con ELISA Indirecta los Municipios de Jalapa, Huimanguillo, Teapa y Tenosique.	36

- Figura 10** Mapa del estado de Veracruz. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de *Neospora caninum* con ELISA Indirecta los municipios de Uxpanapa, Minatitlan, Agua Dulce, Pánuco, Actopan, Tierra Blanca, Cotaxtla, Jesús Carranza, El Higo y Tampico Alto. 38
- Figura 11** Mapa del estado de Chiapas. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de *Neospora caninum* con ELISA Indirecta los municipios de Huixtla, Mapastepec y Tapachula. 41
- Figura 12** Gráfica que muestra los sueros positivos. Muestra la seropositividad baja, media y alta en los municipios de los estados de Guerrero, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas y Tamaulipas. 43

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Resumen de las características morfológicas y biológicas de la familia Sarcocystidae.	5
Cuadro 2	Relación de ranchos muestreados por estado, población muestreada, número de muestras trabajadas, sueros positivos y porcentaje de seroprevalencia a <i>N. caninum</i> .	26
Cuadro 3	Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos, y porcentajes de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Guerrero.	29
Cuadro 4	Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos, y porcentajes de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Oaxaca.	32
Cuadro 5	Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos, y porcentajes de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Tamaulipas.	35
Cuadro 6	Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos, y porcentajes de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Tabasco.	37
Cuadro 7	Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos, y porcentajes de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Veracruz.	39
Cuadro 8	Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos, y porcentajes de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Chiapas.	42
Cuadro 9	Distribución de la seropositividad de menor a mayor de los sueros trabajados que fueron positivos.	43

DEDICATORIA

A mis abuelos: Amada Neri⁺, Enrique Flores, Anastasia Flores⁺ y Marcelo Arriaga por ser la base de una gran familia.

A mis padres: Minerva Arriaga y Clemente Flores gracias por darme la vida, por creer en mí y lograr este importante paso en mi vida.

A mi hermano: José Clemente que a pesar de nuestras diferencias siempre me ha apoyado.

DEDICATORIA

A Dulce Margarita que es la persona más importante de mi vida ya que sin ella no podría haber llegado hasta este momento y sobre todo porque me ha dado el regalo más importante de mi vida; a mi hija Diana Leticia.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo Cuatro por ser parte fundamental en mi formación profesional.

A mi asesor: Dr. José Francisco Morales Álvarez, por darme la oportunidad de colaborar a su lado y compartir conmigo su conocimiento.

A mis compañeras y amigas de del Laboratorio de Diagnóstico, Lupita, Dey, Alma y la Señora Selene por sus valiosas aportaciones para la realización de esta Tesis y por la amistad que surgió entre nosotros.

A mis Amigos de la Universidad, que me brindaron su amistad sincera e incondicional, Adriana, Armando, Claudia, David, Ernesto, Gabriela Flores, Gabriela Zenteno, Juanita, Margarita, Nelly, Norma, Paola, Susan, Victor y Yesica.

A la vecindad: Alejandra, Anuar, Cristina, Fabián, José Luis y Olaf, gracias

“Aprender a saltar una muralla es complicado, pero no cuando cuentas con un gran apoyo,
GRACIAS A TODOS”

RESUMEN

Neospora caninum es un parásito causante de abortos en bovinos entre el segundo y tercer tercio de gestación, aunque es más común el nacimiento de becerros congénitamente infectados. El modo de transmisión es vertical (de madre a hijo) y horizontal (cánidos a herbívoros). La transmisión vertical es el principal mecanismo de perpetuación de la parasitosis, de manera que criar los propios reemplazos puede promover el estado endémico de la infección. Cabe resaltar la relevancia del problema, dada la alta frecuencia serológica encontrada en otros países, lo cual crea la necesidad de adelantar investigaciones con miras a la demostración del agente en otras regiones y establecer la situación epidemiológica del parásito. El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en bovinos de doble propósito criados en clima tropical. Se tomaron 684 muestras de sangre completa sin anticoagulante para la obtención de suero de bovinos de doble propósito para determinar la seroprevalencia de *N. caninum*, utilizando la prueba de ELISA Indirecta. Esta sangre se obtuvo mediante muestreo en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Chiapas, Guerrero, Tabasco y Oaxaca. La seroprevalencia a la infección por *N. caninum* determinada en este trabajo fue de 24.12%. Este porcentaje varía entre los diferentes estados; Guerrero que fue el más bajo con 16.67% y Tabasco que fue el más alto con 50.7%. Como pudo observarse la seroprevalencia de *N. caninum* en ganado de doble propósito fue alta, considerando que son pocos los factores de riesgo para este tipo de ganado. Como ya se mencionó, la neosporosis tiene un impacto negativo más importante en el ganado lechero, debido a que son animales que están en hacinamiento y tienen un mayor manejo zootécnico. La neosporosis bovina tiene aún numerosos enigmas debido a la excelente adaptación del parásito a su hospedero. Aunque se han dilucidado varios aspectos de la biología de *N. caninum*, la neosporosis constituye aún un gran desafío para parasitólogos, inmunólogos y veterinarios. Es necesaria la comprensión de los mecanismos inmunes desencadenados en las infecciones por *N. caninum* para desarrollar inmunógenos que eviten las pérdidas reproductivas o la transmisión de la enfermedad.

I.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de los animales continúan siendo un factor que limita el desarrollo del sector pecuario por las pérdidas económicas que ocasionan en el ganado bovino. Por su parte, uno de los problemas que afectan los parámetros reproductivos y por ende los productivos de una explotación ganadera lo constituyen los abortos. ⁽⁴⁾

El aborto se define como la terminación de la preñez con la expulsión de un feto de tamaño reconocible antes de que sea viable, lo cual se define de manera arbitraria de 42 a 260 días de gestación. ⁽⁴⁾

Dentro de las principales enfermedades que pueden causar abortos están consideradas: Brucelosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), ⁽²²⁾ las cuales han sido tomadas con un mayor interés dentro de los programas sanitarios. Sin embargo, las enfermedades parasitarias, también influyen en el ciclo productivo de los animales, pero a éstas no se les ha dado un interés en carácter de importancia. Entre estos problemas parasitarios se puede considerar a la neosporosis bovina causada por *Neospora caninum*, enfermedad que se ha descrito en diversas partes del mundo como causante de abortos en bovinos productores de carne y leche. ⁽¹³⁾

Desde que se reportó por primera vez como causa de aborto en el ganado, la neosporosis se ha descrito en varios países alrededor del mundo, principalmente en E.U, Canadá, Nueva Zelanda, Holanda, Australia, Irlanda, Japón, Sudáfrica y México. ⁽¹³⁾

1.1. Importancia Económica

N. caninum es reconocida como agente causal de importantes pérdidas económicas en la industria de la carne y leche. En Inglaterra se producen 6000 abortos anuales debido a *N. caninum* y asignándole una pérdida de \$800 dólares por cada aborto. En Australia las pérdidas anuales son de 85 millones de dólares en la industria lechera y 25 millones de dólares en la producción de carne y en E.U.A. las pérdidas anuales serían de 200 millones de dólares. ⁽²⁷⁾ ⁽³⁶⁾ La infección por *N. 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 de 3.5 veces más frecuente que la infección bacteriana más común (*Actinomyces pyogenes*) y 5 veces más frecuente que la infección viral más común (IBR) y desde 1985, *N. caninum* se ha identificado en más de 600 fetos abortados provenientes de más de 250 hatos. ⁽³⁴⁾

En bovinos la enfermedad se caracteriza por provocar aborto entre el segundo y tercer tercio de gestación o el nacimiento de un becerro muerto o vivo pero crónicamente infectado. ⁽³⁶⁾ ⁽⁴⁸⁾

Las pérdidas que se consideran en la industria lechera son: costo por aborto por *N. caninum*, la reposición por eliminación de vientres seropositivos a *N. caninum*, el intervalo parto-concepción y la menor producción láctea de la vaquillona en su primer lactancia. ⁽³⁶⁾

Los eventos que pueden originar tales pérdidas son:

- Muerte fetal temprana con repetición de celo, incremento del intervalo parto concepción o infertilidad.
- Aborto en el tercio medio de la gestación.
- Muerte perinatal o neonatal.
- Incremento en el descarte de vacas. Las vacas infectadas tienen más probabilidad de ser eliminadas por su bajo desempeño reproductivo.
- Reducida producción de leche. Aunque el impacto del aborto en la producción lechera es difícil de estudiar y cuantificar, el incremento del intervalo entre partos puede reducir el número de lactancias si se considera un periodo de años. Así mismo, las vacas infectadas a *N. caninum* no abortadas han mostrado una reducción del 4% de su producción en su primera lactancia.
- Reducido valor económico de la vaca para servicio. ⁽³⁶⁾

En lo que respecta a México, ya se han podido detectar lesiones fetales características en tejido muscular y hepático, quistes parasitarios y taquizoítos en SNC de fetos abortados, lo cual ha sido confirmado a través de la inmunohistoquímica; así como seropositividad utilizando la técnica de ELISA en diversos hatos del Altiplano mexicano. ⁽⁴⁾ Por otra parte, se tiene información y evidencias que permiten reconocer la presencia de *Neospora caninum* y su amplia diseminación por el país. ⁽³⁷⁾

1.2. Etiología

La neosporosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, que ocasiona abortos en bovinos y que afecta de forma natural otras especies como perros, caballos, ovejas, cabras y ciervos. ⁽¹⁰⁾ El agente etiológico es *Neospora caninum*, es un protozooario del phylum Apicomplexa y de la familia Sarcocystidae ⁽¹⁰⁾, cuyo hospedador definitivo es el perro, aunque esta especie puede comportarse también como hospedador intermediario. *N.*

caninum es morfológicamente similar a *T. gondii* y está relacionado a otros protozoos formadores de quistes como *Hammondia* o *Besnoitia*, sin embargo fue descrito como una especie distinta en 1988. ^{(4) (5) (25) (34) (37) (38) (47) (48)} El protozoo es intracelular obligado, infectando a varias células nucleadas, destacando un mayor tropismo por las células de los tejidos placentarios y fetales, donde puede producir aborto en cualquier etapa de la preñez. También presenta afinidad por infectar los tejidos cerebrales fetales, provocando la signología característica en neonatos nacidos enfermos con neosporosis. ^{(21) (26)}

El parásito se encontró por primera vez en 1984 en perros bóxer de Noruega, aunque estudios retrospectivos demostraron que el parásito ha sido endémico por lo menos desde 1957. ^{(4) (25) (34) (37) (38) (47) (48)} Estos perros desarrollaron encefalitis y miositis entre los 2 y 6 meses después del nacimiento, protozoarios semejantes a *T. gondii* fueron encontrados en encéfalo y músculo estriado esquelético. Sin embargo no se encontraron anticuerpos contra *T. gondii* en el suero de estos perros. En 1988 Dubey et al., en E. U. observaron un parásito similar en 10 perros el cual fue nombrado *Neospora caninum*. ^{(4) (25) (34) (38) (48)}

Dicho agente fue posteriormente relacionado no solo con la producción de abortos en bovinos, sino también con la disminución de la producción de carne y leche. ^{(4) (25) (34) (47) (48)}

Cuadro 1. Resumen de las características morfológicas y biológicas de la familia Sarcocystidae.

CLASIFICACIÓN	NOMBRE	CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS
Phylum	Apicomplexa	Formas invasivas con complejo apical
Clase	Sporozoea	Locomoción de formas invasivas mediante movimientos de flexión, ondulación y deslizamiento.
Subclase	Coccidia	El ciclo biológico incluye merogonia, gametogonia y esporogonia.
Orden	Euccocidia	La merogonia tiene lugar en hospedadores vertebrados.
Suborden	Eimeriina	Existe desarrollo independiente de gametos masculinos (microgametos) y femeninos (macrogametos).
Familia	Sarcocystidae	Parásitos heteroxenos y formadores de quistes en el hospedador intermediario (diferentes especies de herbívoros). El hospedador definitivo (diferentes especies de carnívoros) elimina ooquistes en las heces.

1.3. Fases del Parásito.

El ciclo de *N. caninum* comprende de dos etapas. La sexual donde el huésped definitivo (caninos), libera ooquistes (10-11 μ m) que representan el producto final de la reproducción sexual, por medio de las heces, normalmente contienen dentro de ellos 3 ó 4 esporozoitos, que luego de 1-3 días en el ambiente esporulan y son capaces de infectar al hospedero intermediario (bovino, ovino, equino y canino), a partir de agua y alimento contaminados con el parásito. Los esporozoitos liberados en la luz intestinal del hospedero intermediario, son capaces de penetrar el lumen intestinal, desplazándose vía linfática y sanguínea hasta las células blanco, entre las que se encuentran macrófagos, hepatocitos, neuronas, células endoteliales, así como, tejidos fetales y placentarios. La segunda etapa es la asexual, donde los esporozoitos presentes en las células se reproducen mediante endodogonia en taquizoítos (1-4 μ m), que es la forma infectiva de *N. caninum*. Con el fin de protegerse de la acción inmunológica y fisiológica del huésped intermediario, el parásito forma quistes tisulares, que se pueden encontrar en cerebro, hígado, pulmón y músculo esquelético; éstos alojan a bradizoítos (6-8 μ m), que es la forma latente del parásito. En los tejidos antes mencionados se encuentran taquizoítos y bradizoítos que al ser ingeridos por el hospedero definitivo completan el ciclo ^(11, 33, 52). Los taquizoítos que representan la etapa rápida de la reproducción y los bradizoítos que representan la reproducción lenta del parásito, ambas se clasifican como reproducción asexual; Y los ooquistes que representan el producto final de la reproducción sexual. ⁽¹⁾ Mientras los taquizoítos y quistes tisulares se encuentran en los hospedadores intermediarios, los ooquistes se eliminan en las heces del perro. Los taquizoítos tienen forma de media luna o globular, miden 3 a 7 μ m de largo por 1 a 5 μ m de ancho. Los quistes tisulares son redondos u ovales, miden hasta 107 μ m, tienen una gruesa pared y contienen estadios parasitarios de lenta replicación denominados bradizoítos. Ambos, taquizoítos y quistes tisulares son intracelulares. Los taquizoítos han sido descritos en neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células renales y hepatocitos. Los quistes tisulares solo han sido observados en el tejido nervioso, sin embargo, se ha descrito el hallazgo de este estadio en el músculo ocular de un potrillo. Por último los ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo son esféricos, miden 10 a 11 μ m y contienen dos esporocistos con cuatro esporozoitos cada uno. ^{(12) (36) (47)}

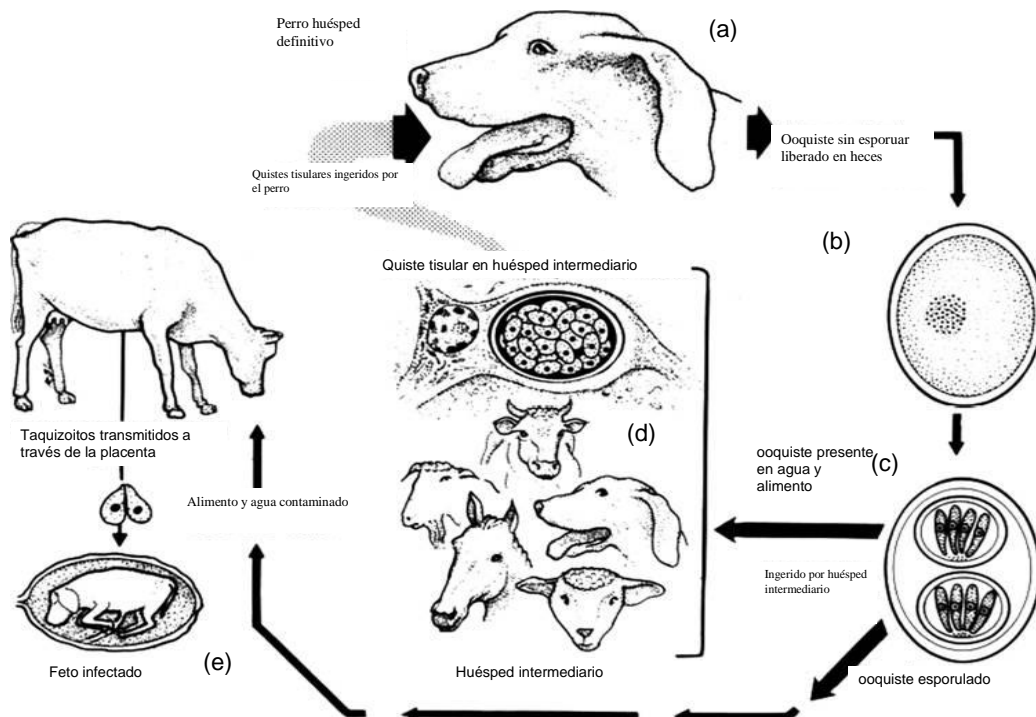


Figura 1 ciclo biológico de *N. caninum* (a) perro hospedero definitivo, (b) ooquiste inmaduro, (c) ooquiste maduro con 4 esporozoitos, (d) animales domésticos hospedero intermediario, (e) feto infectado con taquizoitos y bradizoitos, (f) quistes tisulares en tejidos de hospedero intermediario. ⁽¹³⁾

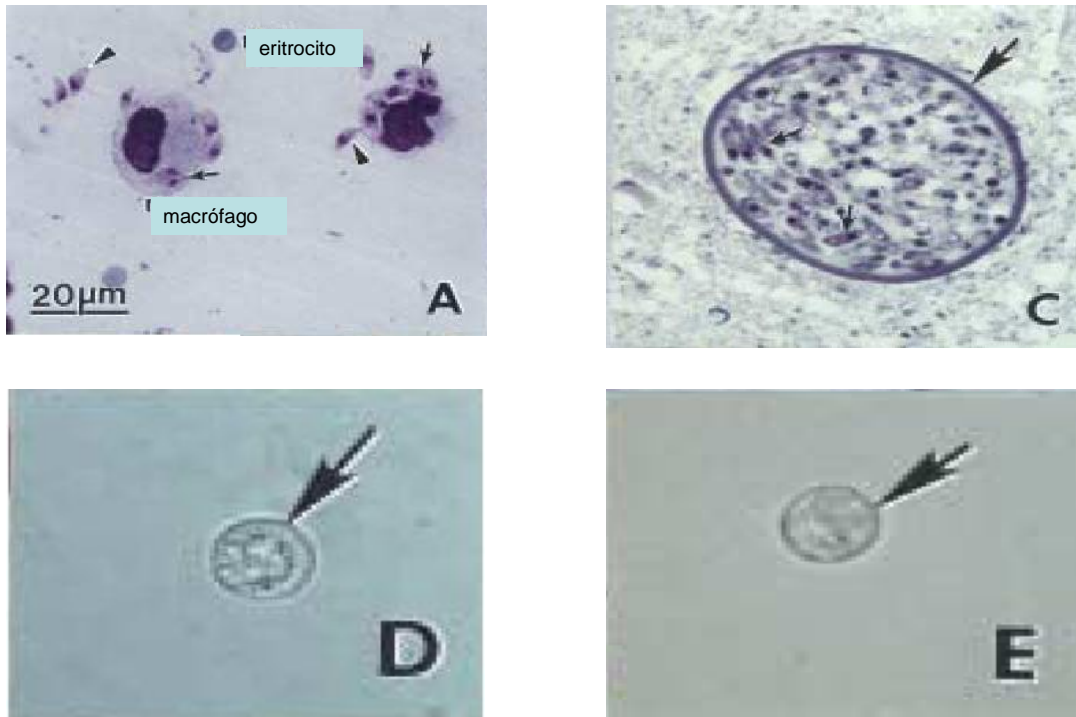


Figura 2. Fotomicrografías de estadios de *N. caninum* (A) taquizoítos en frotis de tejido de pulmón (cabeza de flecha) y taquizoíto en macrófago (flecha), (C) quiste tisular en cerebro, (D) ooquiste inmaduro con un solo esporozoíto (flecha) (E) ooquiste maduro con cuatro esporozoítos (flecha).⁽¹³⁾

La frecuencia con la cual los perros pueden adquirir la infección en la naturaleza es motivo de debate, sin embargo, la infección postnatal de los caninos está demostrada por el incremento de seroprevalencia en perros de mayor edad.⁽⁴⁷⁾

1.4. Patogenia

Aunque la patogenia de *N. caninum* es parcialmente conocida, se cree que posterior a la ingestión de ooquistes, los esporozoitos liberados en la luz intestinal son capaces de atravesar la barrera intestinal y acceder a los tejidos vía el sistema linfático y sanguíneo. En las células huésped infectadas, se inicia el proceso de multiplicación mediante endodiogenia pudiendo el parásito ocasionar daño celular con necrosis e inflamación, o formar quistes tisulares capaces de persistir durante toda la vida del animal. Los bradizoítos alojados en los quistes tisulares del SNC de una hembra gestante pueden reactivarse bajo ciertas influencias hormonales e inmunológicas originando parasitemia.^{(36) (47)}

Luego de la difusión hematogena, los taquizoítos atraviesan la placenta ocasionando, de acuerdo a la edad de gestación, la muerte del feto o el nacimiento de un ternero congénitamente infectado.^{(36) (47)} El aborto ocurre como consecuencia de una

placentitis primaria con focos necróticos en los cotiledones, donde se distribuye al tejido fetal a través de la sangre, generando lesiones al feto a nivel del sistema nervioso central y corazón, ⁽⁴⁴⁾ como consecuencia el feto puede morir y ser absorbido, momificado o expulsado. ⁽¹⁸⁾ A nivel de campo es muy difícil diagnosticar la causa del aborto, ya que no existen lesiones macroscópicas que sugieran a *Neospora caninum* como el agente causal del aborto, suelen encontrarse hallazgos como la momificación, autólisis, sin embargo, no son patognomónicos de la enfermedad. ⁽¹⁶⁾

1.5. Signos clínicos

El aborto es el único signo clínico observado en vacas adultas, que pueden abortar desde los tres meses de gestación hasta término, en donde se ha podido observar que estas vacas por lo general no sufren de retención placentaria, aunque más frecuentemente ocurre entre el quinto y sexto mes. Los fetos pueden morir en el útero, ser absorbidos, momificados, autolisados, nacer muertos; o bien nacer vivos pero crónicamente infectados. ⁽⁴⁾ ⁽³⁴⁾ ⁽⁴⁸⁾ ⁽²⁵⁾ ⁽⁴²⁾ Se desconoce si *N. caninum* ocasiona pérdidas tempranas de preñez, sin embargo, se ha descrito que mientras vacas seronegativas a la enfermedad, reciben 1.7 dosis inseminantes para quedar preñadas, las vacas seropositivas necesitaron 2.2 dosis de semen. El aborto puede producirse en pocas vacas o involucrar hasta el 30% de los animales en un hato. ⁽³⁶⁾ Una vez adquirida la infección (in útero o desde el medio), los animales permanecen infectados probablemente de por vida y pueden transmitir la infección a su descendencia en distintas generaciones, consecutivas o no, con porcentajes que oscilan entre el 50% y el 95%. ⁽⁴⁰⁾

La principal alteración macroscópica es la autólisis. Las lesiones microscópicas son las más significantes en los fetos abortados, presentándose principalmente lesiones en cerebro, médula espinal, miocardio e hígado y ocasionalmente en pulmón y riñones. Estas consisten en necrosis y gliosis multifocal, encefalitis no supurativa, miositis y hepatitis no supurativa. ⁽⁴⁾ ⁽⁴²⁾

En un estudio que se le hizo a fetos de 5 meses de gestación, se encontró en el examen histopatológico evidencia de encefalitis severa necrotizante multifocal no purulenta, hepatitis difusa y miocarditis multifocal, ambas no purulentas. En cortes de tejido encefálico coloreadas con hematoxilina y eosina se observaron numerosas formas

quisticas de protozoarios. El examen inmunohistoquímico reveló estructuras quísticas y taquizoítos de *N. caninum* en diferentes cortes de tejido de áreas basales del encéfalo. ⁽²⁹⁾

En las becerras afectadas, las lesiones en SNC consisten en focos centrales de necrosis rodeados de células inflamatorias mononucleares y células de la Glía. ^{(4) (42)}

En lo que respecta a México, ya se han podido detectar lesiones fetales características en tejido muscular y hepático, quistes parasitarios y taquizoítos en SNC de fetos abortados, lo cual ha sido confirmado a través de la inmunohistoquímica; así como seropositividad utilizando la técnica de ELISA en diversos hatos del Altiplano mexicano. ^{(4) (37)}

1.6. Respuesta Inmune

La neosporosis es una enfermedad que se manifiesta durante la preñez, en donde el feto es particularmente susceptible. Los signos clínicos son raramente observados en vacas no preñadas con excepción de algunos becerros infectados congénitamente que muestran daño neurológico e hiperextensión de miembros. La madre gestante adapta su metabolismo y su sistema inmune proporcionando un medio homeostático y los nutrientes al producto. Así mismo, la preñez está condicionada por mecanismos de tolerancia o rechazo. Factores ambientales externos (infecciones o estrés) pueden desequilibrar el balance madre-producto ocasionando el aborto. ⁽⁵¹⁾ Favorecida por los altos niveles de progesterona, la respuesta inmune Th2 (mediada por linfocitos cooperadores 2) mantiene la preñez mediante la producción de IL4 (interleucina), IL5, IL6, IL9 e IL10 y reducción de la producción de moléculas proinflamatorias como IL12 e IFN-gama (interferón gama), las cuales son perjudiciales para la vida fetal. Uno de los mecanismos más importantes de rechazo del feto involucra un desbalance entre la respuesta Th1/ Th2 a favor de la respuesta Th1. Las interleucinas IL2, IL3 e IL12 promueven actividades citolíticas en macrófagos y NK (del término en ingles “natural killer”), activan la protrombina facilitando la coagulación y la trombosis y estimulan la producción de inmunoglobulinas que activan la cascada del complemento. Las infecciones que promueven una respuesta TH1 alteran el sincitiotrofoblasto. Más aún, el IFN-gama es capaz de actuar directamente sobre este tejido induciendo abortos espontáneos. ⁽⁴⁷⁾

La respuesta inmune generada en las infecciones parasitarias varía según el tipo de parásito. Mientras que los parásitos multicelulares que viven en el espacio extracelular inducen una respuesta TH2 con producción de IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL13, IgG1 e IgE,

los protozoos intracelulares como *N. caninum*, estimulan una respuesta inmune TH1 dominada por la producción de IL12, IFN-gama, e IgG2. Estas últimas citocinas activan vías que generan radicales libres ON, los cuales son letales para dichos parásitos. ⁽⁴⁷⁾

En la neosporosis bovina, se desconoce si el tipo de respuesta inmune generada por la ingestión de ooquistes es similar a la lograda por inoculación de taquizoítos, ya sean inactivados o vivos. Más aún, existirían diferencias entre la respuesta inmune generada por infección prenatal o postnatal. Además, existen evidencias acerca de la variación de antígenos existentes entre los estadios de taquizoítos o bradizoítos. El conocimiento de estas diferencias resulta de importancia para el desarrollo de las medidas de control. ⁽⁴⁷⁾

Los mecanismos dependientes de la inmunidad mediada por células (IMC) son relevantes para controlar un parásito intracelular obligado como *N. caninum*, especialmente por su habilidad para evadir la respuesta inmune. La IMC que involucra a los linfocitos T coopera con la producción de IFN-gama, IL-12 e IL-2 está asociada a la resistencia al protozoo. Experiencias “in vitro” demostraron que el tratamiento de células con IFN-gama recombinante inhibió la multiplicación intracelular de *N. caninum*. ⁽⁴⁷⁾

Ante la estimulación con antígeno de *N. caninum* lisado, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de bovinos infectados proliferaron y produjeron IFN-gama y factor de necrosis tisular (FNT). También ha sido informado que un grupo de antígenos de bajo peso molecular de taquizoítos de *N. caninum* (30kDa) estimularon la proliferación in vitro de linfocitos T CD4₊ obtenidos a partir de terneros experimentalmente infectados. En ese mismo trabajo, la proliferación celular fue acompañada por incremento en la concentración de IFN-gama. Más aún, tratando células con el sobrante de células CD4₊ que respondieron a antígenos de *N. caninum* se logró inhibir la multiplicación del parásito. Cuando se infectaron terneros por la vía oral, las CMSP cultivadas in vitro respondieron al antígeno de *N. caninum* a los 7 días después del desafío. Este tipo de respuesta resultó evidente en células de bazo y células de los ganglios mesentéricos, inguinales y bronquiales hasta 2.5 meses después de la infección. Recientemente, se ha postulado que los mecanismos dependientes de linfocitos citotóxicos serían posibles candidatos para impedir la transmisión vertical en bovinos. Sin embargo, los linfocitos T CD4₊ predominaron sobre

los linfocitos T CD8₊ (células citotóxicas) en linfonodos maternos y fetales de bovino inoculados experimentalmente a los 140 días de gestación. ⁽⁴⁷⁾

Experimentos realizados con ratones han permitido caracterizar no solo la IMC sino también la dinámica de las citocinas durante las infecciones por *N. caninum*. La susceptibilidad de estas especies puede ser aumentada mediante la neutralización de IL-12 e IFN-gama. La producción de IL-12 y luego IFN-gama, resulta un hallazgo constante luego de las infecciones experimentales. Sin embargo, la IL-12 no fue capaz de impedir el progreso de la enfermedad. Por otro lado, se ha mencionado que la neutralización de la IL-4 sumado a la inoculación de una cepa no virulenta de *N. caninum* y posterior desafío con una cepa virulenta, logró reducir la transmisión vertical en ratones. La IL-10, también involucrada en la respuesta TH2, ha sido asociada a la depleción de IFN-gama presente en ratones susceptibles a *N. caninum*. ⁽⁴⁷⁾

La información acerca del rol de las citocinas en respuesta a las infecciones por *N. caninum* en bovinos es escasa. No obstante, algunos estudios, indican que los mecanismos asociados a la respuesta TH1 con producción de IFN-gama e IgG₂ sería la adecuada para controlar la infección. Es necesario establecer si este tipo de respuesta resulta negativa durante la preñez. La modulación de las citocinas podría ser un mecanismo estratégico para la prevención de la transmisión vertical y el aborto. ^{(25) (48)}

Roberts y col. proponen que la madre puede controlar la infección durante el primer trimestre debido a que tiene una respuesta TH1 bien establecida, siendo bajos los niveles de progesterona y la respuesta TH2. Por otro lado, la transmisión vertical ocurre durante el tercer trimestre cuando los altos niveles de progesterona y la respuesta TH2 son incapaces de controlar el protozoo. En contraste, un trabajo reciente menciona que la reactivación parasitaria sería espontánea e independiente de la respuesta inmune. Sin embargo, ese mismo trabajo sugiere que el ambiente en la interfase materno-fetal favorecería el pasaje de *N. caninum* a través de la placenta. ⁽⁴⁷⁾

Durante un brote de abortos ocasionado por *N. caninum*, las vacas crónicamente infectadas resultaron menos propensas a sufrir pérdidas reproductivas que vacas infectadas recientemente siendo baja la avidéz de la IgG en este último grupo. En contraste, se ha mencionado que la baja avidéz de anticuerpos no necesariamente esta con una reciente infección por *N. caninum* aunque puede ser un indicador de riesgo de aborto. ^{(25) (47) (48)}

Finalmente, resulta de interés el rol del óxido nítrico (ON); este metabolito, originado a partir de nitrógeno y producido por macrófagos activados, tiene diversas funciones entre las cuales se mencionan la inmunosupresión y la destrucción de parásitos intracelulares. La adición de un inhibidor del ON a células del bazo de ratones infectados estimuló la respuesta IMC específica. En contraste, ratones deficientes en óxido nítrico sintetasa, enzima que produce ON, son susceptibles a *N. caninum*.⁽⁴⁷⁾

1.7. Mecanismo de transmisión.

El modo de transmisión en el huésped definitivo es vertical de madre a hijo a través de varias generaciones y horizontal por la ingestión de carne, fetos o placentas que contengan quistes o taquizoítos de *N. caninum*, o por consumir ooquistes esporulados excretados por los perros y coyotes,^{(5) (9) (15) (22) (24) (37) (48)} el hospedador definitivo a través de las heces.⁽³⁾ La reproducción sexual se dará en el perro y coyote como hospedadores definitivos,^{(1) (24) (30)} en las células del epitelio intestinal donde debe suceder por lo menos una esquizogonía y gametogonía con la formación de esporozoitos, estos finalmente van a salir por medio de las heces, se cree que existe un hospedador que transporta ooquistes hacia los bovinos.^{(22) (37)} La infección se mantiene en los perros al ingerir los ooquistes, sin embargo también existe la posibilidad de que el perro o el coyote ingiera alimentos de otros animales por carnivorismo, y estos llevan bradizoítos y taquizoítos, los mismos que al ingresar en los hospedadores definitivos desarrollan similares estados asexuales en tejidos y células nucleadas, la transmisión transplacentaria o vertical durante la gestación en las vacas y perros, ha sido demostrada experimentalmente.^{(1) (5) (31)}

La transmisión del parásito de la madre al ternero por el calostro o la leche puede ocurrir, aunque hasta ahora solo se ha demostrado experimentalmente.⁽⁷⁾ Así mismo se ha demostrado recientemente la presencia de ADN del protozoo en el calostro de vacas infectadas.⁽³⁵⁾

El periodo de prepatencia es de 5 días o más, después de que consumen los quistes o taquizoítos. En los hospedadores intermediarios la transmisión puede ser horizontal al consumir los ooquistes que puedan estar contaminando agua o alimento; sin embargo, la transmisión vertical es más frecuente, la cual se origina al romperse los quistes y los taquizoítos presentes en los tejidos de las vacas, y pueden llegar al feto. Esto se puede repetir por varias generaciones como lo muestra la figura 3.^{(1) (36) (37) (48)}

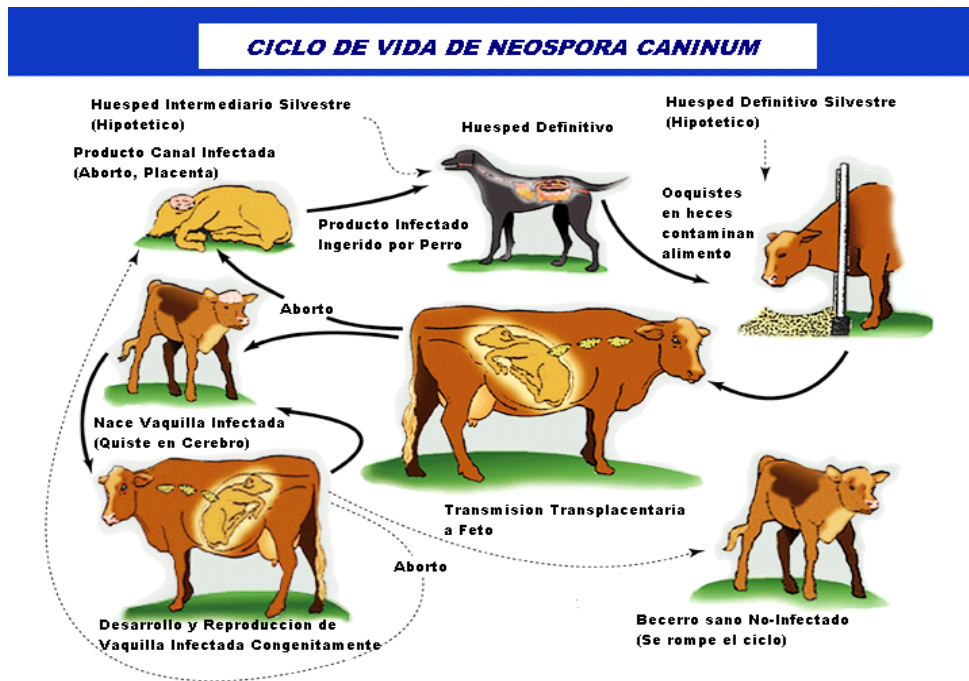


Figura 3. Propuesta del ciclo de vida de *Neospora caninum* ⁽¹⁾

La principal vía de contagio en bovinos es transplacentaria de madre a hijo. ⁽¹⁰⁾ Experimentalmente esta vía ha sido probada en ovinos, caprinos, ratones, caninos, felinos, porcinos y primates. ^{(36) (47)} Las evidencias han demostrado que los bovinos pueden infectarse con *N. caninum* después del nacimiento. Los estudios longitudinales han demostrado un amplio peso de la transmisión de tipo vertical y es aproximadamente del 80% ⁽²⁸⁾

Por otro lado, si bien la transmisión vertical es la forma de infección más frecuente en bovinos, ello no explicaría debidamente el elevado número de hatos infectados. El hecho de haberse determinado que los bovinos pueden tener seroconversión por una exposición postnatal avala la importancia de la transmisión horizontal, motivando intensa investigación el descubrimiento de otras vías de infección postnatal. Además, la transmisión vertical no sería un mecanismo suficiente para mantener la infección en una población bovina debido a que su eficiencia es menor a 100%. ⁽⁴⁷⁾

El patrón endémico es la forma más frecuente de presentación de los abortos causados por Neosporosis y se presenta en hatos donde el parásito se transmite, principalmente, de modo vertical entre generaciones sucesivas. En los rebaños con aborto

endémico, se ha observado una correlación clara entre la seropositividad de las madres y la progeñe con una distribución de los animales seropositivos igual en los diferentes grupos de edad. ^{(8) (50)}

El patrón de aborto epidémico se ha asociado con una infección reciente y la transmisión postnatal del parásito, evidenciado por la falta de asociación entre la seropositividad de las madres y la descendencia y la presencia de IgG anti- *N. caninum* de baja avidéz en los animales abortados. ⁽¹⁸⁾

Aunque los ooquistes presentes en las heces de perros infectados pueden ser infectivos a las 24 horas de ser eliminados, la infección oral en terneros solo se ha descrito en forma experimental. Suponiendo que los ooquistes pueden contaminar el agua y comida de los hospedadores intermediarios, es aún desconocida la frecuencia con que ocurre este hecho en la naturaleza. ⁽³⁶⁾

Recientes trabajos han demostrado que la proporción de bovinos seropositivos aumenta cuando existen perros en los establos. En caninos se ha encontrado un incremento de la seroprevalencia relacionada con la edad, siendo ineficiente la transmisión vertical en esta especie. ⁽²⁾ Así mismo, la seroprevalencia a *N. caninum* es mayor en caninos pertenecientes a zonas rurales que aquella descrita para perros de áreas urbanas. ⁽⁴⁹⁾ Probablemente debido a la estrecha relación epidemiológica existente entre esta especie y los bovinos. ⁽³⁶⁾ Recientemente, se identificaron los coyotes como hospedadores definitivos de *Neospora caninum*. ⁽²⁴⁾ En algunos estudios norteamericanos, la seroprevalencia en los coyotes (10 y 11%) excedió la seroprevalencia en los perros domésticos (7%). ⁽²³⁾

El ciclo de este patógeno en los coyotes y en el venado cola blanca complica las medidas de prevención para controlar la neosporosis en el ganado de carne mantenido en pastoreo. ⁽⁴⁵⁾

1.8. Historia en México.

El primer reporte de aborto asociado a Neosporosis bovina en México, se realizó en seis fetos de un hato de 800 vacas en el noroeste del país aunque *N. caninum* fue confundido con *Hammondia pardalis*. Posteriormente se informó de fetos con lesiones compatibles con neosporosis en Torreón Coahuila. Morales et al., publicaron el primer informe de aborto bovino por *N. caninum* por medio de Histopatología e inmunohistoquímica.⁽²⁵⁾ Por otra parte, se tiene información y evidencias que nos permiten conocer la presencia de *Neospora caninum* y su amplia diseminación por el país, particularmente en el ganado lechero.^{(20) (44)}

1.9. Prevalencia de la Enfermedad en México.

La prevalencia de la enfermedad y su importancia económica es diferente entre regiones ganaderas, así se reportan prevalencias que van de 1% al 58% o más; algunas de las principales características epidemiológicas de la enfermedad hasta la fecha son: es más frecuente en ganado lechero estabulado, al parecer tiene tendencia estacional hacia el invierno, afecta a vacas de todas las edades, puede haber abortos repetitivos, se asocia a la presencia de perros en los establos, una vez presente en el establo se vuelve recurrente y que la presencia de anticuerpos no significa más que la existencia de contacto con el parásito⁽²⁰⁾

En una encuesta serológica en hatos lecheros mexicanos entre 1997 y 1999, se observó una seroprevalencia del 72% en hatos con aborto epidémico y del 36% en hatos con aborto endémico.^{(25) (37) (48)} Otro estudio serológico realizado por García et al., en Aguascalientes informo que de 187 animales de 13 hatos, el 59% fueron seropositivos.⁽³⁷⁾ Sánchez et al., realizaron el primer estudio serológico de Neosporosis en perros de México, comparando la seropositividad entre perros de ciudad y de establo, y en vacas de establos con y sin perros, observando que la seropositividad fue mayor en perros de establo (51.85%) con respecto a los de ciudad (20%) y la seropositividad en vacas fue mayor en establos con perros (58.52%), que sin ellos (35.83%). Todos estos estudios demuestran que la enfermedad está ampliamente difundida en los hatos lecheros mexicanos y que los perros pueden estar involucrados en la transmisión del parásito.^{(25) (48)}

II.- JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades de orden reproductivo (repetición de calores, infertilidad, abortos, momias y absorciones) siguen siendo un factor que limita el desarrollo del sector pecuario por las pérdidas económicas que ocasionan en el ganado bovino.

Actualmente en México, no se cuenta con información referente a la prevalencia e incidencia de *N. caninum* que afecta la fertilidad en el ganado bovino de doble propósito en los trópicos seco y húmedo, y menos aún, considerando las características de las diversas regiones agroecológicas tropicales en las cuales se desarrollan estos sistemas de producción. Lo anterior puede ser explicado, al menos parcialmente, por las políticas nacionales que han puesto poca atención a los sistemas pecuarios de doble propósito, probablemente por considerarlos como sistemas extensivos, o de subsistencia, en los cuales la infraestructura y los insumos dedicados a la producción son escasos y generalmente de menor calidad, que utilizan pastos nativos o introducidos, como principal fuente de alimento. Sin embargo, considerando que el sistema de producción antes citado contribuye con un alto porcentaje de cabezas de bovino tanto para la producción nacional de leche como para la de carne, es de primordial importancia integrarlos de manera eficiente a estos mercados.

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 establecer técnicas de diagnóstico rápidas y económicas como lo es la técnica de ELISA y así poder establecer medidas de prevención y control confiables.

III.- OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia por serología de *Neospora caninum*, agente infeccioso involucrado como causa de aborto en ganado de doble propósito, en diferentes regiones del trópico mexicano.

Objetivos particulares

Determinar y conocer la prevalencia de *N. caninum* en bovinos de doble propósito mantenidos en estados con clima tropical de la República Mexicana, mediante la prueba serológica de ELISA.

Determinar la presencia de anticuerpos contra el parásito *N. caninum*.

Discutir los factores de riesgo de Neosporosis en ganado de doble propósito.

Calcular la prevalencia de la parasitosis en el ganado de doble propósito.

IV.- HIPOTESIS

Si la presencia de abortos en el ganado de doble propósito del trópico mexicano se encuentra asociado a diferentes agentes etiológicos, entonces una de las posibles causantes es *Neospora caninum* cuya seroprevalencia puede ser determinada mediante pruebas serológicas como ELISA. Su prevalencia puede ser variable pero siempre impactando de manera negativa la eficiencia productiva de estos animales.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar de trabajo

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Diagnóstico del CENID Microbiología Animal - INIFAP ubicado en el Km. 15.5 Carretera Federal México- Toluca, col. Palo Alto D.F. durante el periodo agosto de 2008 – marzo de 2009.

El trabajo se desarrollo de sueros obtenidos de un proyecto en el cual se quería saber la situación de las principales enfermedades abortivas en bovinos de doble propósito. Los sueros fueron obtenidos de hatos ubicados en 6 estados con clima tropical de la república mexicana: Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Tamaulipas, Tabasco y Chiapas.

6.2 Selección de hatos

Se tomaron 684 muestras sangre completa sin anticoagulante para la obtención de suero de bovinos de doble propósito para determinar la seroprevalencia de *N. caninum*, utilizando la prueba de ELISA Indirecta. Esta sangre se obtuvo mediante muestreo en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Chiapas, Guerrero, Tabasco y Oaxaca. El tamaño de muestra fue establecido siguiendo la tabla de valores de Cannon y Roe (1982). Los bovinos seleccionados cumplieron con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

1. Ser de productores cooperantes que cuenten con un mínimo de 30 animales dedicados a la reproducción.
2. Ser animales nacidos en la unidad de producción, sin importar la raza.

6.3 Metodología general de campo

Los animales se sangraron en la vena coccígea, previa desinfección de la zona ubicada en la línea media ventral de la cola, entre la tercera y séptima vértebra coccígea, empleando tubos Vacutainer provistos de un gel para separar el paquete celular del suero; la cantidad de sangre extraída fue de aproximadamente 7 ml. Los tubos con las muestras de sangre fueron centrifugados por 15 minutos directamente en el campo a 3,000 r-p-m; de inmediato se separo el suero y se refrigeró en hielo y se transportó al laboratorio donde se almacenó en congelador a -10°C hasta su análisis.

6.4 Prueba serológica

Para la detección de anticuerpos tipo IgG Anti-Neospora se utilizó la prueba de ELISA indirecta, empleando un “kit comercial”, que se basa en un inmunoanálisis enzimático que detecta anticuerpos contra *N. caninum* en suero bovino de laboratorio IDEXX, siguiendo el protocolo del mismo, el cual se llevó a cabo como sigue:

- 1.- Se hace una dilución 1:500 del suero problema con el diluyente proporcionado.
- 2.- Se utilizó un formato de microtitulación con placas de 96 pozos que están recubiertas de antígeno de *Neospora*. Se toman 100µl del suero diluido y se coloca en uno de los pozos tapizados con el antígeno de *N. caninum* de la placa de microtitulación, dejando el primer y último par para los controles negativo y positivo. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Esto forma un complejo con los antígenos recubiertos.
- 3.- Cada pozo se lava 4 veces con 300µl de solución de lavado para eliminar de los pozos los anticuerpos que no reaccionaron con el Ag presente en el fondo de la placa y también para eliminar impurezas presentes. Se desecha el excedente sacudiendo la placa en papel absorbente.
- 4.- Se añaden 100µl del conjugado anti-bovino: peroxidasa de rábano que se unen a los anticuerpos ligados a cada pozo. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Y se repite el lavado para desechar el conjugado no unido.
- 5.- Se colocan 100µl del sustrato de enzima (peróxido de Hidrógeno) y un cromógeno (tetrametilbencidina 3,3', 5,5' a cada pozo, se incuba por 15 minutos, éste produce una coloración azulosa al unirse con las reacciones Ag-Ac; la coloración es proporcional a la cantidad de reacción presente en el pozo.
- 6.- Se adiciona al sustrato 100µl de solución de “frenado” en el mismo orden que se vertió el sustrato y se coloca la placa en el lector de ELISA a 630 (DO), éste dará los resultados en densidad óptica dependiendo de la coloración de cada pozo.
- 7.- Se evalúa la prueba con la densidad óptica de los controles positivo y negativo, y se calcula el valor S/P de los sueros, sometiendo el valor de la densidad óptica de cada suero a una fórmula, proporcionada por el fabricante.

Para que el ensayo sea válido, la diferencia (P-N) entre el promedio del control positivo (PC \times), y el promedio del control negativo (NC \times) tiene que ser mayor o igual que, 0.150. Además, el NC \times debe ser menor o igual que 0.20. Las muestras de suero con cocientes S/P menores que 0.50 se clasificaron como NEGATIVAS hacia los anticuerpos

contra *Neospora*. Cuando el cociente S/P fue mayor o igual que 0.50, las muestras se clasificaron como POSITIVAS hacia los anticuerpos contra *Neospora*.

*IDEXX Laboratories

VI.- RESULTADOS

Se tomaron un total de 3715 muestras de suero de bovinos de doble propósito de 231 ranchos en seis estados de la República Mexicana con clima tropical. Los estados muestreados fueron Tamaulipas, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Guerrero. De todas las muestras solo se procesaron al azar aproximadamente el 20 % (864) para la determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum*.

En el estado de Tamaulipas se trabajó en 21 ranchos donde se tomaron 345 muestras, de los cuales únicamente se procesaron por ELISA Indirecta 45 sueros. La seroprevalencia para este estado para *Neospora* fue del 29%. Destacando en este estado el Rancho 2, donde la seroprevalencia alcanzó el 75 %. En este rancho se encuentra el suero con mayor seroprevalencia del estado (3.2M/P), cuando la mayoría se encuentran en un rango bajo de positividad. (Cuadro 2) (Cuadro 5) (Cuadro 9)

En el estado de Tabasco de 54 ranchos se analizaron 71 sueros al azar de 678 animales muestreados. De la cual se obtuvo una seroprevalencia de 51%. De este estado destacan el rancho 2 y 4 que tienen una seroprevalencia muy alta que va del 100% y 50% respectivamente. De los 4 ranchos muestreados, la mayoría de los sueros positivos están por encima de 1 M/P y hasta 4 M/P. Cabe resaltar que en el rancho 4 se encuentra el suero con mayor positividad (4.46M/P) y también el de menor seropositividad (0.75) del proyecto estatal. (Cuadro 2) (Cuadro 6) (Cuadro 9)

Por otro lado, en el estado de Chiapas se trabajaron al azar 58 sueros de 784 muestras, para procesar con ELISA Indirecta. De esta prueba 19 fueron positivos dando una seroprevalencia de 33%. De este estado se muestrearon 31 ranchos; donde sobresale el rancho 3 con una seroprevalencia del 40%. Aunque en contraste con la seroprevalencia tan alta del estado de Tabasco aquí se presentan los sueros con mayor M/P del proyecto; se obtuvo un 5.288 M/P del Rancho 1 y 5.046 M/P del rancho 3. (Cuadro 2) (Cuadro 8) (Cuadro 9)

Por otro lado, el estado de Guerrero presenta la seroprevalencia más baja del proyecto, de este estado se tomaron 761 muestras, de los cuales se analizaron 222 sueros para ELISA indirecta. De esta prueba 37 fueron positivos dando una seroprevalencia de 17% que es la más baja del proyecto. Cabe mencionar que de los 71 ranchos muestreados, los ranchos 7 y

9 tienen una seroprevalencia de 41% y 58% que contrastan con el 0% y 8% que tiene la mayoría de los ranchos. (Cuadro 2) (Cuadro 3) (Cuadro 9)

En cambio, en el estado de Oaxaca, donde se obtuvieron 319 muestras de los cuales se procesaron al azar 234 sueros para ELISA Indirecta. 47 sueros fueron positivos dando una seroprevalencia de 20%. De los 23 ranchos analizados, el rancho 5 tiene la seroprevalencia más alta (44%), al igual que el suero con menor seropositividad del proyecto (0.5037 M/P). (Cuadro 2) (Cuadro 4) (Cuadro 9)

Y por último, en el estado de Veracruz, se tomaron 828 muestras, de estas se trabajaron 54 sueros para ELISA Indirecta. De los 31 ranchos muestreados se obtuvo una seroprevalencia de 24%. En este estado el rancho 7 tiene una seroprevalencia de 60% que sobrepasa el promedio del estado. (Cuadro 2) (Cuadro 7) (Cuadro 9)

El 24.12% (165/864 sueros muestreados) de los sueros examinados en este estudio resultaron con valores superiores a 0.50 M/P lo cual los catalogó como positivos a la presencia de Anticuerpos contra *N. caninum* y el 75.87% (519/864) fueron considerados negativos. Figura 5

Cuadro 2. Relación de ranchos muestreados por estado, población muestreada, número de muestras trabajadas, sueros positivos y porcentaje de seroprevalencia a *N. caninum*.

Estado	Número de ranchos muestreados	Número de animales Muestreados	Muestras trabajadas	Positivos	Porcentaje de Seroprevalencia
Tamaulipas	21	345	45	13	29
Chiapas	31	784	58	19	33
Oaxaca	23	319	234	47	20
Tabasco	54	678	71	36	51
Veracruz	31	828	54	13	24
Guerrero	71	761	222	37	17
Total	231	3715	684	165	24.12

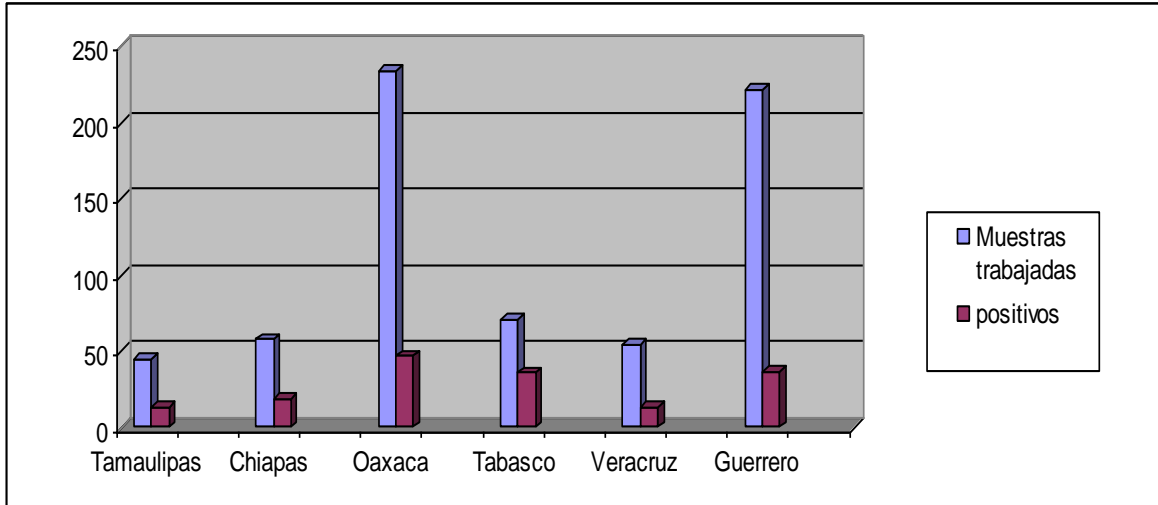


Figura 4. Distribución de las muestras trabajadas y sueros positivos, en las regiones de los estados de Tamaulipas, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Guerrero. Donde se observa a los estados de Oaxaca y Guerrero con mayor número de muestras trabajadas. También tenemos que el estado de Oaxaca presenta el mayor número de animales positivos del proyecto.

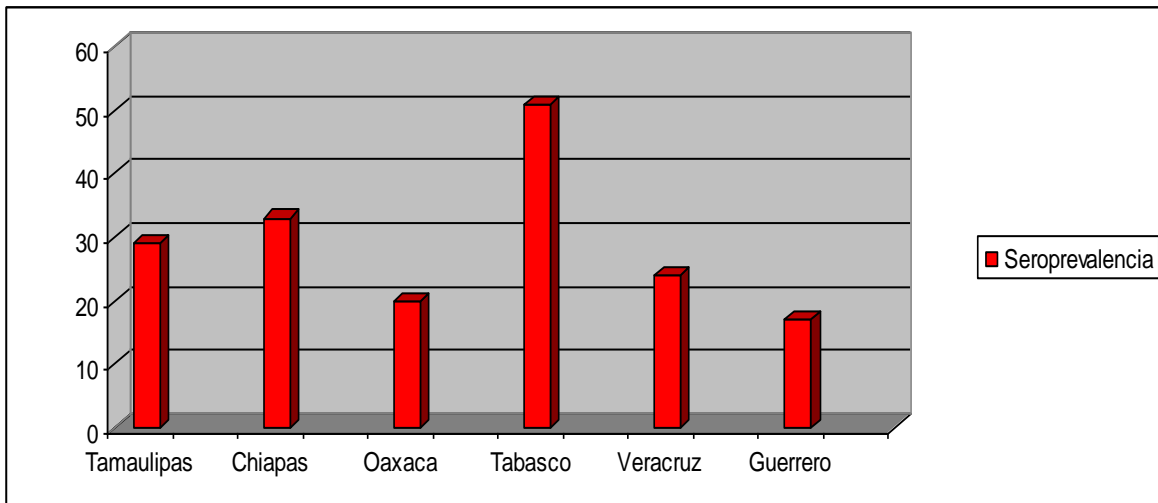


Figura 5. Distribución de la seroprevalencia en las distintas regiones trabajadas de los estados de Tamaulipas, Chiapas, Oaxaca, Tabasco, Veracruz y Guerrero. En esta gráfica se observa que el estado de Tabasco tiene la más alta seroprevalencia del proyecto y el estado de Guerrero presentó la seroprevalencia más baja.

Guerrero
División Municipal



■ Municipios trabajados

Figura 6. Mapa del estado de Guerrero. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de *Neospora caninum* con ELISA Indirecta los municipios de Copala, Tlapehuala, Pungarabato, Tixtla de Guerrero, Coyuca de Benítez, Benito Juárez, José Azueta, Tecpan y Tlalchapa.

Cuadro 3. Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos y porcentaje de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Guerrero.

GUERRERO			
Rancho	Número de Muestras procesadas	Número de sueros positivos	Seroprevalencia
1.- “D” Mpo. copala	79	17	21.51
2.-“B” Mpo. Tlapehuala	39	0	0
3.- “San Jerónimo” Mpo. Pungarabato	12	0	0
4.-“Francisco Ayala” Mpo. Tixtla de Guerrero	12	0	0
5.- “Israel Ramírez Radilla” Mpo. Coyuca de Benítez	12	1	8
6.- PLPE Mpo. Benito Juárez	12	1	8
7.- “Las Ollas” Mpo. José Azueta.	17	7	41
8.- Eli Nuñez Zarco Mpo. Tecpan	14	4	28
9.- “Colorado” Mpo. Tlalchapa	12	7	58

10.- Facundo Zamora” Mpo. Tecpan	13	0	0
TOTAL	222	37	17

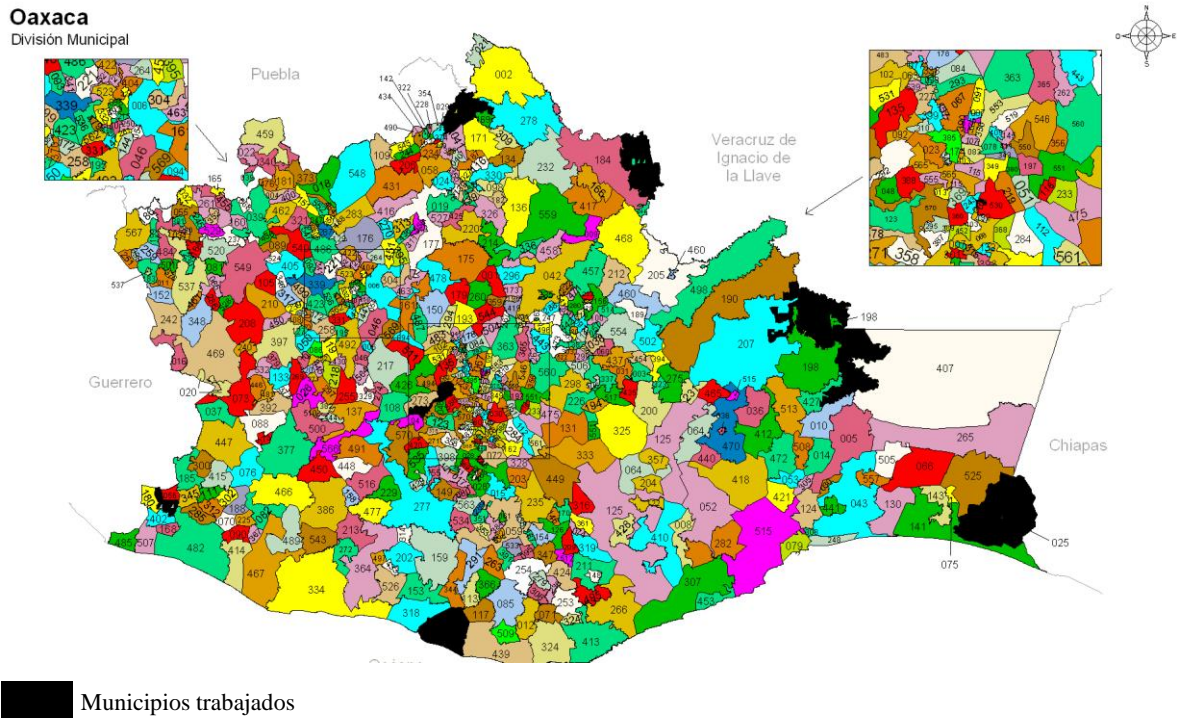
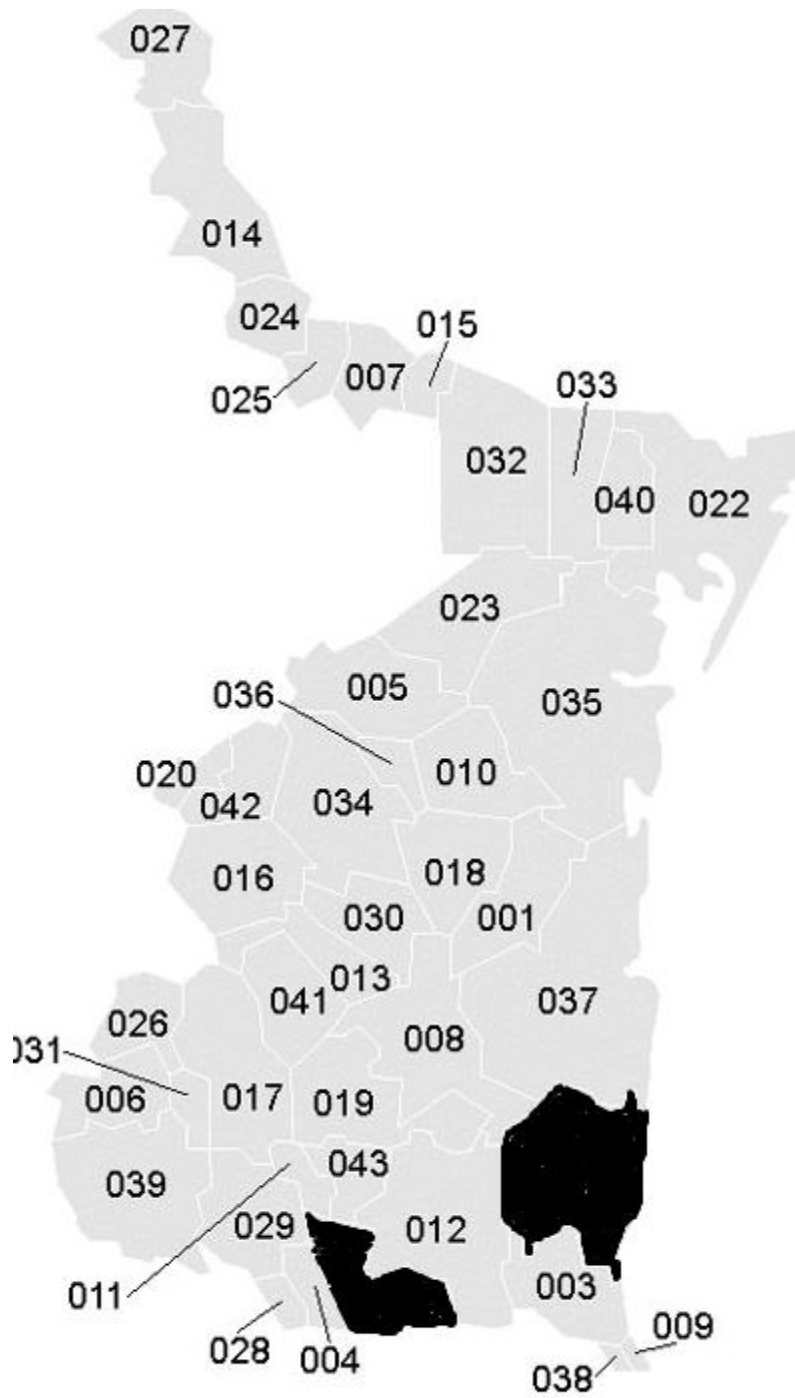


Figura 7. Mapa del estado de Oaxaca. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de *Neospora caninum* con ELISA Indirecta los municipios de San Pedro Tapanatepec, Santiago Llano Grande, Ocotlan de Morelos, San Pablo Cuatro Venados, Loma Bonita, Chahuities, Matías Romero Avendaño, Santa María Colotepec y Santa María Chilchotla.

Cuadro 4. Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos y porcentaje de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Oaxaca. Rio Grande, Chahuites, Matías Romero Avendaño.

OAXACA			
Rancho	Número de Muestras procesadas	Número de sueros positivos	Seroprevalencia
1.- Melecio de los Santos Fuentes Mpo. San Pedro Tapanatepec	53	7	13
2.- Jorge Francisco de los Santos Mpo. San Pedro Tapanatepec	30	6	20
3.- Cruz Salinas Aquileo Mpo. Santiago Llano Grande	33	5	15
4.- Franco Nivon Fuentes Mpo. Ocotlán de Morelos.	20	2	10
5.- Constantino Domínguez Mpo. San Pablo Cuatro Venados.	25	11	44
6.- Israel Soberanis Mpo. Loma Bonita	27	8	30
7.- Pedro Lorenzana Mpo. Chahuites	8	1	12
8.- Nils Banda Hnap Mpo. Matías Romero Avendaño	15	3	20
9.- Antonio Trujillo Mpo. Santa María Colotepec	16	4	25

10.- Carlos Betanzos Mpo. Santa María Chilchotla.	7	0	0
TOTAL	234	47	20



■ Municipios trabajados

Figura 8. Mapa del estado de Tamaulipas. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de *Neospora caninum* con ELISA Indirecta los municipios de Aldama y Mante.

Cuadro 5. Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos y porcentaje de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Tamaulipas.

TAMAULIPAS			
Rancho	Número de Muestras procesadas	Número de sueros positivos	Seroprevalencia
1.- “El potrillo” Mpo. Mante	12	2	17
2.- “las Palmas” Mpo. Mante	8	6	75
3.- “Santa Martha” Mpo. Aldama	13	3	23
4.- “El 7.5km” Mpo. Mante	12	2	17
TOTAL	45	13	29

Tabasco
División Municipal




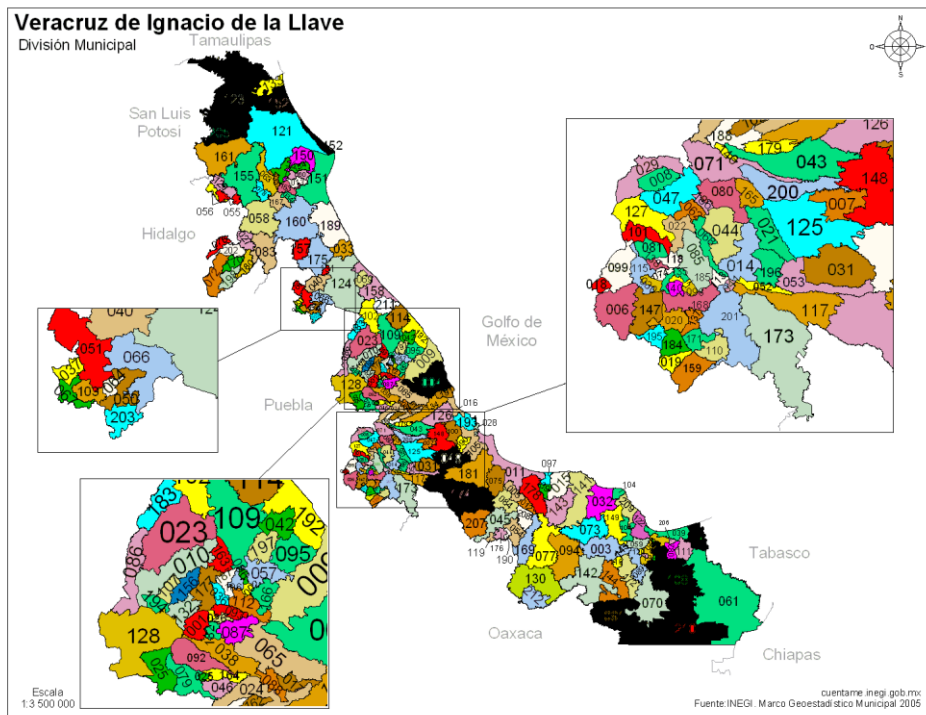
 Municipios trabajados

Figura 9. Mapa del estado de Tabasco. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de *Neospora caninum* con ELISA Indirecta los Municipios de Jalapa, Huimanguillo, Teapa y Tenosique.

Cuadro 6. Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos y porcentajes de seroprevalencia en los distintos hatos muestreados del estado de Tabasco.

TABASCO			
Rancho	Número de Muestras procesadas	Número de sueros positivos	Seroprevalencia
1.- “El triunfo” Mpo. Jalapa	17	4	23
2.- “La paloma” Mpo. Huimanguillo	15	15	100
3.- México lindo” Mpo. Teapa	19	7	37
4.- El lirio” Mpo. Tenosique	20	10	50
TOTAL	71	36	51



■ Municipios trabajados

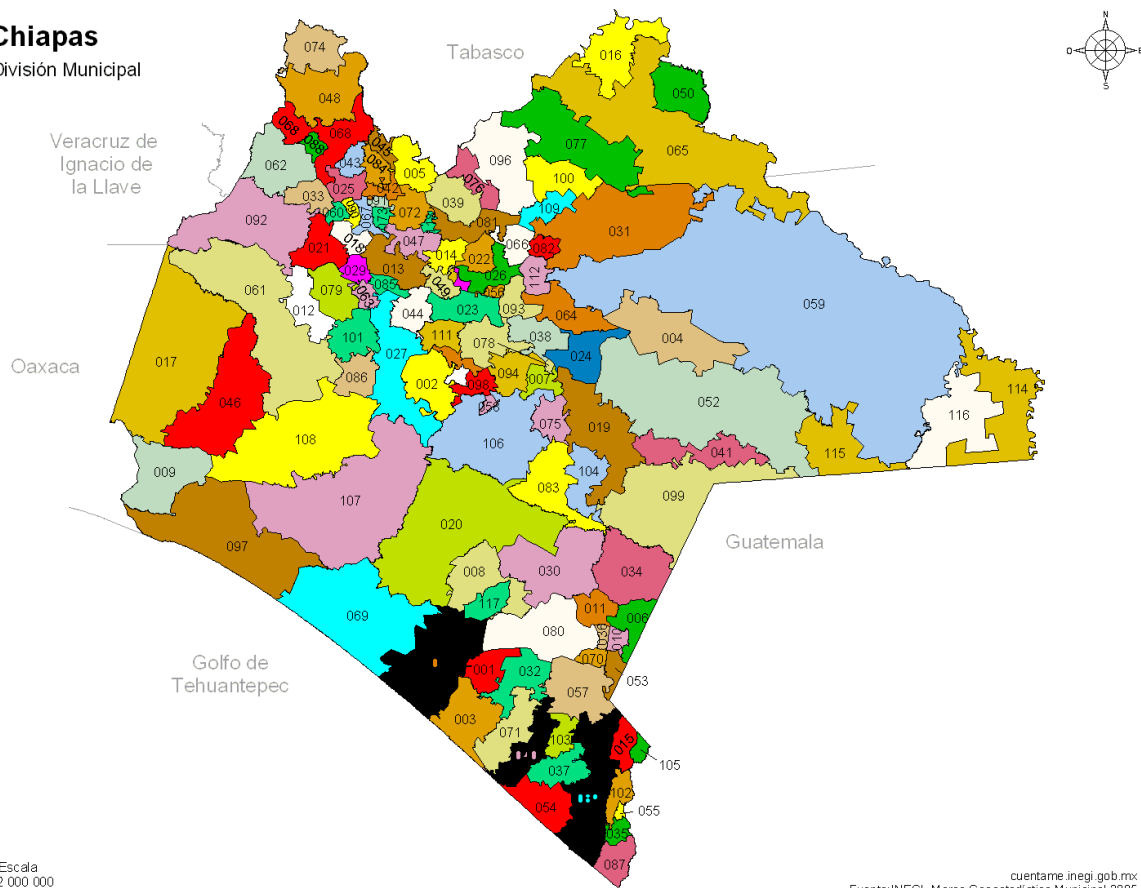
Figura 10. Mapa del estado de Veracruz. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de *Neospora caninum* con ELISA Indirecta los municipios de Uxpanapa, Minatitlan, Agua Dulce, Pánuco, Actopan, Tierra Blanca, Cotaxtla, Jesús Carranza, El Higo y Tampico Alto.

Cuadro 7. Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos y porcentajes de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Veracruz.

VERACRUZ			
Rancho	Número de Muestras procesadas	Número de sueros positivos	Seroprevalencia
1.- "CH-3" Mpo. Uxpanapa	4	2	50
2.- "Acayucan 1" Mpo. Minatitlán	4	0	0
3.- "Suchilapa" Mpo. Agua Dulce	6	3	50
4.- "Soteapa1" Mpo. Pánuco	8	3	37
5.- "NA" Mpo. Actopan	5	1	20
6.- Pedro Morales Mpo. Tierra Blanca	6	0	0
7.- "Santa Ana" Mpo. Cotaxtla	5	3	60
8.- Jesús Carranza Mpo. Jesús Carranza	8	1	12
9.- CH-9 Mpo. El Higo	5	0	0
10.- Parcela escolar Mpo. Tampico Alto	3	0	0
TOTAL	54	13	24

Chiapas

División Municipal



■ Municipios trabajados

Figura 11. Mapa del estado de Chiapas. Fueron muestreados y trabajados para la prueba de *Neospora caninum* con ELISA Indirecta los municipios de Huixtla, Mapastepec y Tapachula.

Cuadro 8. Distribución de las muestras procesadas, sueros positivos y porcentaje de seroprevalencia en los distintos ranchos muestreados del estado de Chiapas.

CHIAPAS			
Rancho	Número de Muestras procesadas	Número de sueros positivos	Seroprevalencia
1.- Meapa Huixtla	22	5	23
2.- Mapastepec	16	6	38
3.- Tapachula	20	8	40
TOTAL	58	19	33

Cuadro 9. Distribución de la seropositividad de menor a mayor de los sueros trabajados que fueron positivos. Donde se observa al estado de Chiapas y Tabasco con mayor número de animales con seropositividad alta.

SEROPOSITIVIDAD	BAJA 0.5 - 2.0	MEDIA 2.01 – 3.5	ALTA mayor a 3.51
TAMAULIPAS	7	6	0
CHIAPAS	9	4	4
OAXACA	27	2	0
TABASCO	23	9	4
VERACRUZ	12	1	0
GUERRERO	45	9	1

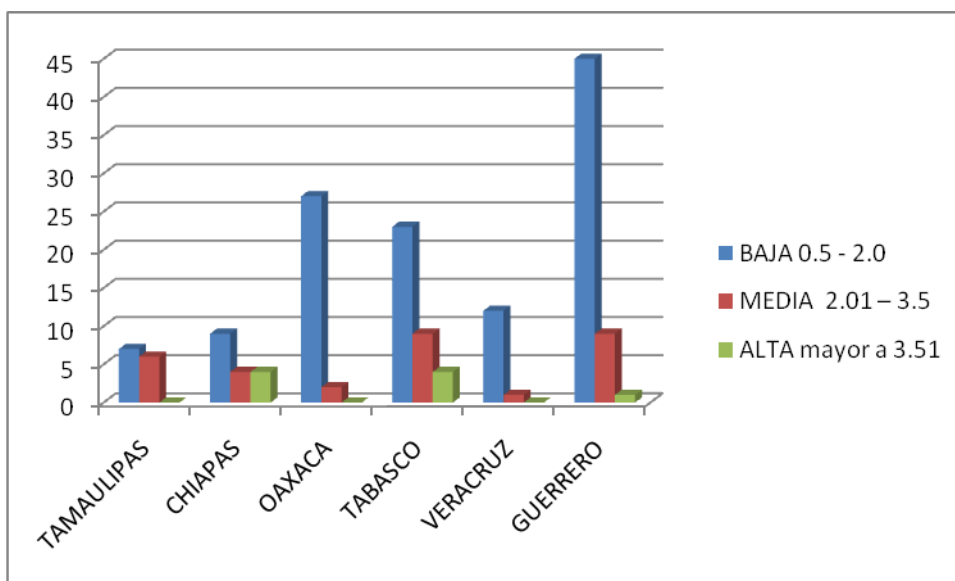


Figura 12. Gráfica que muestra los sueros positivos. Muestra la seropositividad baja, media y alta en los municipios de los estados de Guerrero, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas y Tamaulipas.

VII.- DISCUSIÓN

Si bien no es posible afirmar la participación de otras etiologías causantes de trastornos reproductivos como por ejemplo: IBR, leptospirosis, DVB, brucelosis entre otras; en la población de animales bajo estudio, la seropositividad contra *N. caninum* indica que este agente debe ser incluido en el diagnóstico diferencial de diversas patologías que afectan la reproducción en bovinos de la región. En la actualidad existen muchas formas de diagnóstico para la identificación de anticuerpos contra *N. caninum* ⁽¹⁾. En el presente trabajo se utilizó la técnica de ELISA indirecta por ser un método de diagnóstico de Neosporosis bovina a través de la detección de Anticuerpos en suero de vacas sospechosas ⁽¹⁾. El diagnóstico de la neosporosis en el ganado vacuno es complejo, debido a la falta de sintomatología clara que permita diferenciarla clínicamente de otras infecciones que también pueden causar abortos en los bovinos. Esta técnica tiene una sensibilidad del 88% y una especificidad del 97% ⁽¹⁾. Además que se ha sugerido que el estado serológico puede considerarse como un adecuado indicador del riesgo de aborto por *N. caninum*. ⁽³⁷⁾

La neosporosis bovina es una enfermedad causada por *N. caninum*, que en los últimos años ha tomado gran importancia debido a su impacto como causal de problemas reproductivos en el ganado bovino ⁽⁴⁶⁾. Esta enfermedad fue detectada en el año de 1997 por Morales et al, quienes publicaron el primer informe de aborto bovino por *N. caninum* por medio de Histopatología e Inmunohistoquímica ^{(25) (47)}. A partir de ese estudio se han realizado más investigaciones como por ejemplo, Calzada C. P. entre 1995 y 1997 realizó un Diagnóstico Histopatológico en el cual, el 37% de los fetos estudiados fueron compatibles con neosporosis y a la par realizó también un diagnóstico serológico por ELISA indirecta, en el cual, 54% de los sueros fueron positivos ⁽⁴⁾. En un estudio serológico en hatos lecheros mexicanos entre 1997 y 1999, se observó una seroprevalencia del 72% de frecuencia en hatos cuyo rango de abortos va del 13 al 30% y del 36% en unidades productivas con el 12% en el caso de abortos ⁽³⁷⁾. Recientemente, se ha reportado información sobre la seroprevalencia a *N. caninum* en hatos lecheros de Aguascalientes, encontrándose ésta en un valor mayor o igual al 50% ⁽²⁰⁾. En otro estudio buscando la seroprevalencia de enfermedades relacionadas con falla reproductiva (abortos) en bovinos de leche en diferentes Estados de la República Mexicana el cual incluía los estados de Guanajuato, Veracruz, Querétaro, Edo. de México y Aguascalientes se encontró una

seroprevalencia promedio de 33%.⁽⁵³⁾ En un estudio de determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum* en perros y bovinos de explotaciones lecheras en la región de Tizayuca Hidalgo, se observó que hay 51.85% de prevalencia en perros de establos, y los bovinos de dichos establecimientos demostraron tener mayor indicios de la enfermedad, resultando positivos a la presencia de anticuerpos contra el parásito 158 de 270 animales (58.51%), mientras bovinos de explotaciones con ausencia de perros solo 43 de 120 (35.83%) resultaron positivas a la presencia de la enfermedad.⁽⁴⁷⁾ Un estudio reciente cuestiona la frecuencia con la cual los perros pueden adquirir la infección en la naturaleza. En dicho trabajo 9 perros de 2 a 4 años de edad fueron alimentados con fetos bovinos naturalmente infectados con *N. caninum*, sin embargo los cánidos no eliminaron ooquistes en la materia fecal resultando nula la evidencia clínica, serológica, o histopatológica a *N. caninum*.⁽³⁶⁾

Actualmente se cree que la enfermedad ésta ampliamente distribuida en todo el territorio nacional^{(25) (48) (53)}, como lo demuestra el presente estudio, donde se observan seroprevalencias que van del 17 al 51%.⁽⁵³⁾

La situación en otros países es similar como por ejemplo: un trabajo realizado en suiza nos indica una seroprevalencia de 40% en ganado lechero⁽⁴⁶⁾, en España se presentó una seroprevalencia que va del 32% y llega hasta un 52% en ganado de carne y en algunas explotaciones de ganado de leche se detectó una prevalencia de hasta 87%⁽³⁹⁾, en Brasil se realizó un muestreo donde se obtuvo una seroprevalencia del 39.1%⁽⁶⁾; y finalmente en Perú se demostró una prevalencia del 29%⁽⁴³⁾. Por otro lado, Francia presenta una prevalencia del 21%, a demás se realizó un estudio seroepidemiológico en ganado productor de leche, donde se observó una correlación alta del 17% al 45%, entre el ADN del parásito presente en los fetos y las respuestas serológicas de los sueros de las madres⁽⁴¹⁾; en Japón se realizó un estudio donde se detectó un 26% de prevalencia de la enfermedad, en un muestreo realizado en Australia se demostró que el 21% de su ganado presenta anticuerpos contra *N. caninum*, al igual que en Holanda donde se presentó un 25% de prevalencia⁽¹⁴⁾. Y finalmente en Estados Unidos se detectó una prevalencia de la enfermedad del 24%⁽¹²⁾, lo que nos demuestra que la enfermedad ampliamente difundida en todo el mundo.⁽¹²⁾

Se tienen reportes de que los bovinos especializados en producción de leche se ven mayormente afectados por la enfermedad, posiblemente a causa de la forma de explotación a la cual son sometidos, mientras que en los bovinos de carne se presentan con menos frecuencia. Como lo indican los resultados obtenidos por Fort 2003, en un estudio seroepidemiológico en la región de La Pampa Argentina, donde se tomaron muestras de 97 explotaciones lecheras y 24 dedicadas a la producción de carne, en las cuales al menos en cada una de las ranchos de bovinos de leche poseían al menos un animal con presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum*, con una seroprevalencia de 20.3%, mientras que en las explotaciones de bovinos de carne se obtuvo un valor de prevalencia de 7% y solo el 28% de este tipo de producciones en comparación al 92% de leche tuvieron una prevalencia mayor al 10%.⁽¹⁹⁾ Se tienen pocos datos acerca de la prevalencia de neosporosis en bovinos de doble propósito en México. Recientemente se encontraron prevalencias de este tipo de animales en Veracruz en un estudio en los municipios de Jalapa y Veracruz, se realizó evaluación de 555 sueros de bovinos de doble propósito de los cuales 372 pertenecían a Jalapa y 89 resultaron positivos (23.92%), 183 eran de Veracruz y 16 de éstos fueron positivos (8.74%).⁽¹⁷⁾ Estos resultados difieren del presente estudio, ya que las seroprevalencias aunque bajas, alcanzaron hasta el 100% por ejemplo, en un rancho de Tabasco.

Así tenemos que por ejemplo; en el estado de Guerrero a pesar de ser el estado con menor seroprevalencia del proyecto, se observaron ranchos con seroprevalencias altas de 41% y 58% respectivamente. En este estado se presenta una seropositividad baja. Cuadro 8.

El estado de Oaxaca presenta una seroprevalencia baja.

Sin embargo, el estado de Tamaulipas tiene una seroprevalencia elevada debido a que el rancho N° 2 presentó una seroprevalencia del 75% que contrasta con el 17% que presentaron los ranchos 1 y 4. A pesar de tener un rancho con alta seroprevalencia, se observó una seropositividad media (2.01-3.5) y baja. (0.5-2.0)

Por otro lado, el estado que tiene resultados muy contrastantes es Tabasco ya que tienen seroprevalencias que van desde el 23% hasta el 100%. Este estado presenta 4 animales con seropositividad de más de 3.51 (alta). Cuadro 8

El estado de Chiapas presenta una seroprevalencia alta en todos los ranchos muestreados con un promedio de 33%. Revisando su seropositividad podemos darnos

cuenta que es un estado al que hay que ponerle más atención ya que presenta 4 animales con seropositividad media y 4 con seropositividad alta.

No se obtuvo información acerca del diagnóstico de laboratorio sobre causa de abortos en el historial de los animales; fueron contados los hatos que seguían un calendario de vacunación para prevenir las principales enfermedades causantes de aborto, como Brucelosis, IBR y DVB.

Como podemos notar, ya comienza a observarse una importante diseminación de la prevalencia de anticuerpos a *N. caninum* en el ganado de doble propósito, ya que, por ejemplo, en la mayoría de los ranchos crían sus propios reemplazos, por lo que no se puede detectar diferencias de los que crían sus reemplazos y los que los adquieren de otros establos estatales, nacionales o extranjeros.

La manera de prevenir su entrada y diseminación en un rancho es evitar la introducción de animales positivos o infectados, detectar y reducir los reservorios de infección y aplicar medidas cuarentenarias.⁽⁵³⁾ Para poder llevar a cabo un programa de control eficiente hay que tomar en cuenta que en los canidos se ha encontrado un incremento de la seroprevalencia relacionada con la edad, siendo ineficiente la transmisión vertical en esta especie. Por otra parte también se ha identificado que los coyotes son hospedadores definitivos de *N. caninum*. En algunos estudios norteamericanos, la seroprevalencia en los coyotes (10 y 11%) excedió la seroprevalencia en los perros domésticos (7%).⁽²³⁾ y el venado cola blanca es hospedero intermediario, por lo que estos factores complican las medidas de prevención para controlar la neosporosis en el ganado de doble propósito que ésta en pastoreo.⁽⁴⁵⁾

VIII.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el presente trabajo se determinó una seroprevalencia variable, pero que en algunos casos, como en el estado de Tabasco alcanzó el 100% por lo que *N. caninum* debe tomarse en cuenta e incluirla como diagnóstico diferencial de diversas patologías que afectan la reproducción en bovinos de la región.

Estos resultados no demostraron la presencia de la enfermedad en los animales seropositivos, pero si la evidencia de contacto con el agente, lo que sugiere que en algún momento de la vida el contacto con el agente indujo la formación de anticuerpos específicos. Por lo anterior, se deben considerar la utilización de otras técnicas de diagnóstico para detectar animales enfermos y poder realizar el aislamiento del agente etiológico.

La neosporosis bovina tiene aún numerosos enigmas que descifrar debido a la excelente adaptación del parásito a su hospedero. Aunque se han descrito numerosos aspectos de la biología de *N. caninum*, la neosporosis constituye aún un gran desafío para parasitólogos, inmunólogos y veterinarios; Por lo que es necesaria la comprensión de los mecanismos inmunes involucrados en las infecciones por *N. caninum* para desarrollar inmunógenos que eviten las pérdidas reproductivas asociadas a este agente.

IX.- LITERATURA CITADA

1. Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. Neosporosis in cattle Anim. Reprod. Sci. 2000; 60-61: 417-431.
2. Basso W, Venturini L. Moore DP, Rambeau M, Unzaga JM. Prevalence of *N. caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. J. Parasitol. 2001b; 87: 906-907.
3. Bergeron N, Girard C, Paré J, Fecteau G, Robinson J, Baillargeon P. (2001a): Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to fullterm calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 173-175.
4. Calzada CP. Producción bovina valores Hematológicos en vacas Holstein seropositivas a *Neospora caninum* de la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo (Tesis de licenciatura). Estado de México Cuautitlán: UNAM, 1999.
5. Cebrián LM, Barberán M, y Ferrer LM. Neosporosis y aborto en el ganado. Gabinete Técnico Veterinario S.L. San Mateo de Gallego y Depto. De Patología Animal. Facultad de Veterinaria Zaragoza, España 2000. www.providesas.com.
6. Coberllini LG, Drimeier D, Cruz CFE, Gondim LFP, Wald V. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sud, southern Brazil. Vet. Parasitol. 2002; 103: 195-202.
7. Davison HC, Guy JW, McGarry F, Williams DF, Kelly and AJ Trees. Experimental studies on the transmission of *N. caninum* between cattle. Res. Vet. Sci. 2001; 70:163-168.
8. Dijkstra T, Barkema H. W, Eysker M and Wounda W. Evidence of post-natal transmission of *N. caninum* in Dutch dairy herds. Int. J. Parasitol. 2001^a; 31: 209-215.
9. Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wounda W, Barkema W. Dogs shed *N. caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *N. caninum* tachyzoites. Int. J. Parasitol. 2001b; 31: 747-752.
10. Dubey JP. Neosporosis in cattle. J. Parasitol. 2003; 42-56.
11. Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. The Korean Journal of parasitology 2003. vol 41 No. 1.1-16 march 4/11/08

12. Dubey JP, Barr CB, Barta RJ, Bjerkas I, Björkman C, Blagburn LB, Bowman DD, Buxton D, Ellis TJ, Gottstein B, Hemphill A, Hill ED, Howe KD, Jenkins CM, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh EA, Mattsson GJ, McAllister MM, Modry D, Omata Y, Sibley DL, Speer AC, Trees JA, Ugglá A, Upton JS, Williams LDJ, Lindsay SD. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. Int. J. Parasitol. 2002;32: 929-946.
13. Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. Vet. Parasitol 2006; 140: 1-34.
14. Echaide EI. La neosporosis bovina. Jornada sobre enfermedades emergentes del bovino. INTA Rafaela, provincia de Santa Fe. FAV UNRC, Rio Cuarto, Argentina. 2000.
15. Echaide IE. La Neosporosis Bovina. Med. Vet. 2000; 1-6.
16. Ellis JT, McMillan D, Ryce C. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. Int. J. Parasitol. 1999; 29: 1589-1596.
17. Figueroa VJ. Factores de riesgo asociados con la infección por *Neospora caninum* en ganado de doble propósito de la zona centro de Veracruz, México [tesis maestría]. México, DF. UNAM; 2009.
18. Forar AI, Gay JM, Hancock DD, Gay CC. Fetal loss frequency in ten Holstein dairy herds. Theriogenology 1996; 45: 1505-1513.
19. Fort M. *Neospora caninum*, Estudio seroepidemiológico en Bovinos de la Provincia de la Pampa. 2003. disponible: <http://www.inta.gov.ar/anguil/info/publicaciones/pdf/publi52.pdf>
20. García VZ, Cruz VC, García TD, Medina EL, Chavarria B. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, México. Vet. Parasitol. 2002; 106: 115-120.
21. García GFA, Lista MDA. Neosporosis y Tricomoniasis. Manual de ganadería de doble propósito, Maracay-Venezuela. Especialización en Reproducción Bovina, División de Estudios para Graduados, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela. 2005
22. Givens DM. A clinical, evidence-based approach to infectious causes of infertility in beef cattle. Theriogenology 2006; 66: 648-654.

23. Gondim LF. *Neospora caninum* in wildlife. Trends Parasitol. 2006.
24. Gondim LF, McAllister M.M. Coyotes (*canis latrans*) are definitive hosts of *N. caninum*. international journal for Parasitology. 2004; 34:159-161.
25. Gutiérrez GJ, Vázquez CC, Medina LE, Valdivia AF. Factores de Manejo Asociados con la Seroprevalencia a la infección por *N. caninum*, en Ganado Lechero de Aguascalientes. Vet. Méx. (2007). 38:3; 261-270.
26. Haddad JPA, Dohoo IR, VanLeewen A. A review of *Neospora caninum* in diary and beef cattle a Canadian perspective. Can. Vet. J. march 2005; 46 (3); 230-243 disponible: [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)
27. Hobson CJ, Duffield FT, Kelton D, Lissemore K, Hietela SK, Leslie KE, McEvans B, Cramer G, Peregrine AS. *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2002; 221: 1160-1164.
28. Innes EA, Wright SE, Maley S. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. Int J Parasitol. 2001; 31: 1523–1534.
29. Lértora WJ, Burna A, Catuogno MS. Diagnóstico Histopatológico de Aborto Bovino por *N. caninum*. Rev. Vet. (2004) 15: 2, 85-88.
30. Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet. Parasitol. 1999; 82: 327-333
31. McAllister MM, Björman C, Anderson-Sprecher R, Rogers DG. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. JAVMA (2000); 217: 881-887.
32. Moore DP. Actualización en Neosporosis Bovina. Sitio Argentino de Producción Animal. 2006; 1-20.
33. Moore DP, Odeón AC, Campero CM, Neosporosis bovina: una actualización, Vet. Arg. 2001; Vol. XVIII. N° 180: 752-775.
34. Moore DP, Odeón AC, Venturini MC, Campero CM. Neosporosis bovina, inmunidad y vacunación. Revista Argentina de microbiología (2005) 37; 217-228.
35. Moskwa B, Pastusiak K, Bien J, Cabaj W, The first detection of *N. caninum* DNA in the calostrum of infected cows. Parasitol Res. In press. 2006;

36. Morales SE. Diagnóstico Inmunológico y Epidemiología de la Neosporosis en el Altiplano Mexicano. (Tesis de doctorado). México D.F., UNAM. 1999.
37. Morales SE, Trigo TF, Ibarra F, Puente E, Santacruz M. Neosporosis in Mexican dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *J Comp Path* 2001^a; 125: 58-63.
38. Otranto D, Llazari A, Testini G, Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Veterinary Parasitology* (2003); 118: 7–18.
39. Pedreira J, Díaz P, Suárez JL, Arias M, Lomba C, Paz-Silva A, Diéz BP, y Morrondo MP. Estrategia recomendada para el diagnóstico y control de la Neosporosis Bovina en Galicia. Depto. Patología Animal. Facultad de Veterinaria. España. 2004.
40. Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gonzalo A, Seijas-Carballedo A, Ortega-Mora L.M. Observational studies in *N. caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations, in Hemphil, A., Gottstein, B. A. European perspective on *N. caninum*. *J. Parasitol.* 2000; 30: 906-909.
41. Pitel PH, Pronost S, Chatagnon G, Tainturier D, Fortier G, Ballet JJ. Neosporosis in bovine dairy herds from the west of France: detection of *Neospora caninum* DNA in aborted fetuses, seroepidemiology of *N. caninum* in cattle and dogs. *Vet. Parasitol.* 2001; 102: 269-277.
42. Radostits O M. Tratado de las Enfermedades del Ganado Bovino, Ovino, Porcino, Caprino y Equino. Volumen II 9º Edición. Editorial Mc Graw-Hill. España 2002
43. Rivera GH, Nelson D. y Tabacchi, NL. *Neospora caninum* y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del Valle de Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2000.11: 1-7.
44. Rojas CM. Neosporosis canina. *Parasitol. Vet.* 2003; 33: 227-232.
45. Rosypal AC, Lindsay DS. The sylvatic cycle of *Neospora caninum*: where do we go from here? *Trends Parasitol.* 2005; 21: 439–40.
46. Sager HD, Hüsey D, Kuffer A, Schreve F and Gottstein B. Mise en evidence d'un de "abortion storm" (transmission transplacentaire exogene de *N. caninum*) dans une exploitation de vaches laityères: une premiere en Suisse. *Ach Tierheilkd.* 2005; 147: 113-120.

47. Sánchez GFD. Determinación de Anticuerpos Anti-*N. caninum* en Perros Provenientes de Explotaciones Lecheras y su Correlación con Neosporosis Bovina en Hatos Seleccionados. (Tesis de Médico Veterinario Zootecnista). México D. F. 2001.
48. Sánchez GFD. Diagnóstico de Neosporosis Bovina en fetos, por Inmunohistoquímica y PCR del gen pNc5 y el ITS-1. (Tesis de Maestría). México D. F., UNAM. 2006.
49. Sánchez GF, Morales SE, Martínez M.J, Trigo JF. Determination and correlation of anti-*N. Caninum* antibodies in dog and cattle from Mexico. The Canadian Journal of Veterinary Research. 2003; 67: 142-145.
50. Schares G, Barwald A, Staubach C, Söndgen P. Rauser M, Schroder R, Peters M. and Conraths FJ. p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *N. caninum*-associated bovine abortion. Vet. Parasitol. 2002; 106: 293-305.
51. Thellin O, Heinen E. Pregnancy and the immune syst: between tolerance and rejection. Toxology. 2003; 185: 179-184.
52. Valenzuela P. Neosporosis en bovinos y caninos. Mon. Electr. Patol. Vet. 2005; 2(1): 17-33.
53. Zenteno R. G. Perfil Serológico para los principales agentes infecciosos asociados con problemas reproductivos en bovinos de leche en diferentes estados de la República Mexicana (Tesis Licenciatura). Estado de México Cuautitlán: UNAM, 2008.