



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**DETERMINACIÓN DE LA SEROPOSITIVIDAD A
Neospora caninum EN UN HATO DE BOVINOS
PRODUCTORES DE LECHE DEL ESTADO DE MÉXICO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

MARIO ABRAHAM MAYÉN ANGUIANO

ASESOR: DR. FERNANDO OSNAYA GALLARDO

COASESOR: DRA. PATRICIA BEATRIZ GARCÍA REYNA

CUAUTILÁN IZCALLI EDO. DE MEX.

2010



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.

Índice

1.- Resumen.....	4
2.- Introducción.....	5
2.1.- Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	7
2.1.1.- Ciclo intestinal o enteroepitelial en el hospedero definitivo	7
2.1.2.- Ciclo en el hospedero intermediario	8
2.2.- Epidemiología de la neosporosis	11
2.2.1.- Inmunopatología de <i>Neospora caninum</i>	14
2.2.2.- Diagnóstico.....	20
2.2.3.- Prevención y control.....	23
2.2.4.- Importancia económica	30
2.2.5.- Problemas de salud pública	31
3.- Hipótesis.....	32
4.- Objetivo.....	33
5.- Materiales y métodos.....	34
6.- Resultados	39
7.- Discusión.....	44
8.- Conclusiones.....	45
9.- Referencias bibliográficas.....	46

Índice de cuadros

1.- Cuadro 1: Ciclo biológico de <i>N. caninum</i>	10
2.- Cuadro 2: Mapa de ubicación de la explotación lechera.....	34
3.- Tabla 1: Frecuencias de seropositividad a anticuerpos contra <i>N.caninum</i> en el hato de bovinos productores de leche.....	39
4.- Gráfica 1: Frecuencias relativas de suero positivos y negativos en vacas en producción y vaquillas de reemplazo.....	40
5.- Tabla 2: Resultados de la determinación de la densidad óptica y cálculos requeridos para la determinación de los valores cocientes S/P	40
6.-Gráfica 2: Valores del cociente S/P a anticuerpos contra <i>N.caninum</i> obtenidos de la prueba ELISA Herd Check en vacas en producción y vaquillas de reemplazo.	41
7.-Tabla 3: Valores de cociente S/P y densidad óptica de los sueros correspondientes a las vacas en producción y vaquillas de reemplazo para la determinación de la seropositividad a anticuerpos contra <i>N. caninum</i>	42

1.- Resumen.

El trabajo experimental se realizó en una explotación localizada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. El objetivo del presente trabajo fue determinar la seropositividad a *Neospora caninum* en un hato de bovinos productores de leche con antecedentes de abortos aunque sin registros precisos de los mismos.

La investigación se realizó en la totalidad de animales de la explotación, se utilizaron 59 muestras de sueros que se evaluaron por duplicado para la detección de anticuerpos anti-*N.caninum*, mediante la utilización de un kit comercial de ELISA, El resultado mostró un 55.9% de seropositividad en el hato, presente en cada uno de los lotes analizados. Concluyendo que existe una seropositividad en el hato lo que nos demuestra que la infección se encuentra latente en los animales de nuestra investigación.

2.-Introducción.

Los problemas reproductivos caracterizados por infertilidad, muerte embrionaria, abortos, malformaciones congénitas y neonatos débiles son comunes en el ganado bovino ocasionando serias pérdidas económicas ^{1,2}. Estos problemas reproductivos tienen múltiples etiologías como el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), el herpes bovino 1 (VHB-1) agente causal de la rinotraqueítis infecciosa bovina, *Neospora caninum* así como las bacterias *Brucella abortus* y *Leptospira harjo* los cuales están ampliamente distribuidos en la población bovina ^{3,4}.

Neospora caninum es un protozooario, fue aislado por primera vez por Dubey y *Cols.* en perros durante 1988 ⁵. Algunos años después se demostró que estaba relacionado de manera importante con el aborto en el ganado bovino tanto en la ganadería de leche como en la dedicada a la producción de carne ⁶. La neosporosis bovina se ha identificado en muchas partes del mundo incluyendo América del Norte, Europa, Asia, Africa, Australia y América del Sur. En México, Morales y *Cols.*; 2001 describieron un caso de aborto bovino debido a *N. caninum* y más tarde en otros estudios se determinó una seropositividad del 56% en diferentes hatos del Altiplano Mexicano ⁷. La infección en los bovinos se asocia a la pérdida de las crías que se caracteriza clínicamente por abortos con mayor frecuencia entre el quinto y sexto mes de gestación. Aparte del costo económico de la reproducción fallida, la infección por *N. caninum* puede también causar pérdidas económicas indirectas como resultado del desecho prematuro y baja en la producción de leche.

En Australia, se examinaron 729 fetos abortados de vacas y el 21% se asociaron a la presencia de *N. caninum* ⁸, y en hatos lecheros californianos el 42.5% de un total de 266 fetos abortados examinados fueron seropositivos a *N. caninum* concluyendo que este parásito era la causa principal del aborto ⁹. Actualmente, en Ontario Canadá *N. caninum* es la causa infecciosa más común del aborto. No todos los animales que son seropositivos a *N. caninum* presentan abortos, sin embargo, el riesgo de que se presenten en las vacas seropositivas se estimó que es dos veces mayor que para las seronegativas ¹⁰.

Por otro lado en un estudio llevado a cabo en Australia con 68 vacas seropositivas se determinó un porcentaje del 26% de abortos y solamente el 3% en 117 vacas seronegativas ¹¹. En términos generales los animales seropositivos a *N. caninum* tienen de 3 a 4 veces mayor posibilidad de abortar que los animales seronegativos ¹²⁻¹⁴.

Varias investigaciones alrededor del mundo indican que la transmisión vertical es la ruta primaria por la cual los bovinos se infectan con *N. caninum*. En el Reino Unido se determinó una transmisión vertical a las crías del 95.2% en 118 vacas seropositivas ¹⁵. Otra investigación realizada en 23 animales promedió un 21.9% de seropositividad con un rango de 4.3 al 61.8% con un índice de transmisión vertical del 44.4% y una variación de 0 a 85% dentro del hato ¹⁶. Sin embargo, para los hatos con una alta incidencia, el desecho de todos los animales infectados dentro de un período corto no es una manera práctica de eliminar *N. caninum* del hato, lo que genera una necesidad de desarrollar estrategias óptimas para reducir o limitar las infecciones por este parásito.

La neosporosis bovina se diagnostica en animales adultos utilizando métodos indirectos como inmunofluorescencia indirecta y ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas o a través de métodos directos utilizando fetos abortados como muestra, entre estas incluyen técnicas como la histopatología, inmunohistoquímica y recientemente la de proteína C-reactiva.

La PCR se considera una técnica altamente específica y sensible para la detección de la infección de *N. caninum* en fetos ¹⁷. En México es imprescindible el establecimiento de técnicas diagnósticas que permitan conocer el estatus de la neosporosis y sus repercusiones sobre la eficiencia reproductiva y productiva. Para el diagnóstico, los estudios serológicos por ELISA tienen una sensibilidad de 98.6% y especificidad de 98.8%, la sensibilidad de la prueba es la medida de su capacidad de detectar verdaderos positivos. Debe ser calculada sobre muestras positivas mientras que la especificidad de la prueba es la medida de su capacidad de detectar verdaderos negativos. Por lo que debe ser calculada sobre muestras negativas.

2.1.- Ciclo biológico de *Neospora caninum*

La neosporosis es una enfermedad parasitaria que afecta caninos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos y ciervos causada por el protozoario *Neospora caninum*¹⁸, el cual es un parásito intracelular perteneciente a la familia *Sarcocystidae* phylum *Apicomplexa*, estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii*.¹⁹⁻²² En el ciclo de vida el perro es el hospedador definitivo²³⁻²⁵, así como también el coyote²⁶. El perro también puede comportarse como hospedero intermediario²⁷, pero también se involucran otros hospederos intermediarios, entre los que se incluyen bovinos, ovinos, caprinos, equinos y búfalos de agua. Existen diferentes estudios que han encontrado serología positiva a *N.caninum* en animales salvajes y marinos^{22,28,29}. Los estadios parasitarios reconocidos son: los trofozoitos que presentan 2 variantes los bradizoitos que se desarrollan durante la infección crónica formando las colonias terminales en las vísceras y tejido muscular, la otra variante es el taquizoito que se presenta durante la infección aguda y que tiene afinidad por infectar las células fagocíticas y las endoteliales de los hospederos intermediarios.

Otra fase observada es la de ooquiste que es expulsado con las heces en una condición inmadura, produciéndose su maduración en el ambiente exterior, esta fase se presenta en los hospederos definitivos(el perro puede desempeñarse en los dos tipos de rol, el de hospedero intermediario y el hospedero definitivo), si bien se ha dilucidado el ciclo biológico de este organismo y sigue un comportamiento parecido al de otros coccidios intestinales es muy alta la probabilidad de que existan varias fases evolutivas precursoras de los ooquistes en el hospedero definitivo. (Cuadro 1)

En el ciclo de vida se consideran dos fases. Una fase intestinal o enteroepitelial que se desarrolla en el epitelio del hospedero definitivo y la que se desarrolla en el hospedero intermediario con una fase inicial aguda con predominio de bradizoitos³⁰. (El perro desempeña los dos papeles)

2.1.1.-Ciclo intestinal o enteroepitelial en el hospedero definitivo.

Es la fase que se desarrolla dentro del hospedador definitivo, una vez ingeridas las colonias terminales los bradizoitos se liberan de sus cubiertas penetrando el epitelio de las vellosidades de la porción baja del intestino delgado, una vez dentro de estas células crecen

adquiriendo un aspecto ameboide conocido como trofozoito, el cual divide su núcleo varias veces situándose en la periferia formándose abultamientos en la membrana, finalmente cada núcleo se rodea de una porción de citoplasma dando lugar a la formación de tantos individuos nuevos como núcleos se habían formado anteriormente llamados merozoitos (fase esquizogónica); Las células hospedadoras estallan y los merozoitos son liberados, al cabo de unos días (cinco o siete) algunos merozoitos evolucionan hacia formas sexuales o gametos (fase gametogónica), el resto de los merozoitos invaden otras células, el microgametocito masculino madura y produce entre 12 y 32 microgametos. Otros merozoitos forman otro tipo de células llamadas macrogametocitos que al madurar forman macrogametos que son de tipo femenino. La fecundación del macrogameto ocurre dentro de la célula hospedadora y el cigoto resultante (fase esporogónica) se recubre de una pared resistente que finaliza con la formación de ooquistes no esporulados, que son descargados con la materia fecal de 8 a 14 días post infección por un período latente variable, en condiciones ambientales favorables pueden esporular en 24 a 48 hrs ²³. Una vez que esporulan en el ambiente, contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno ²⁴, morfológicamente son similares a los ooquistes de *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, *Sarcocystis sp.* e *Isospora sp.* también parásitos del perro ²⁵.

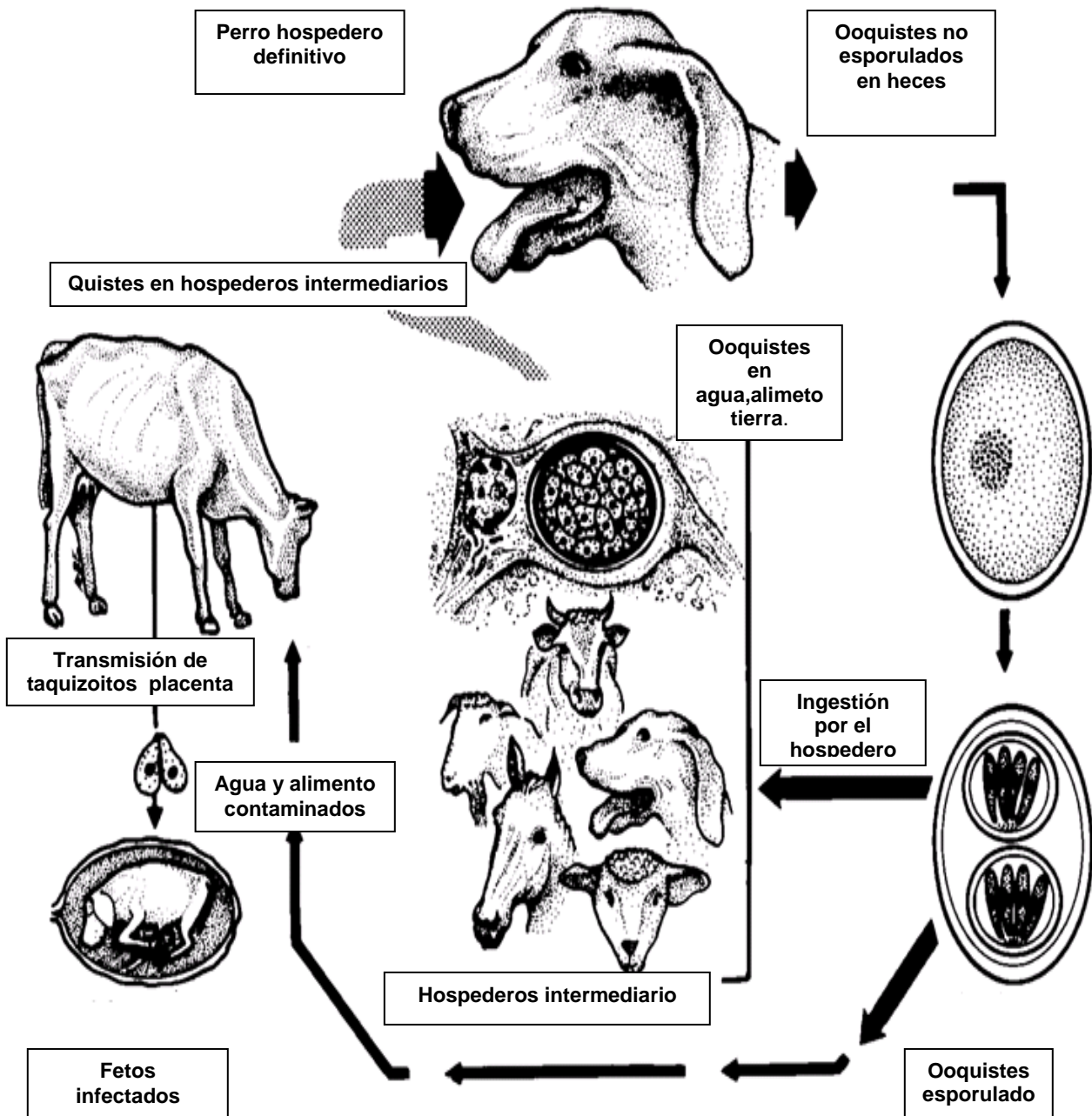
2.1.2.- Ciclo en el hospedero intermediario.

Una vez que el hospedero intermediario ingiere los ooquistes esporulados se liberan los esporozoitos que pueden atravesar la capa enteroepitelial y son fagocitados por macrófagos del sistema retículo endotelial. La penetración celular también ocurre por movimientos propios del parásito. Ya en el interior los esporozoitos se multiplican de forma muy rápida (taquizoitos) dentro de una vacuola parasitófora formada en la célula hospedadora. El proceso culmina con la destrucción de la célula parasitada y con la liberación de los taquizoitos los cuales son desplazados por células hemáticas fagocíticas móviles invadiendo nuevas células del mismo tejido o por esta vía llegan a otros tejidos ³¹. Los taquizoitos miden de 3-7 x 1-5 µm se localizan en una gran variedad de tejidos como fibroblastos, células endoteliales, miocitos, hepatocitos, células nerviosas etc. ^{32,33}. Se reproducen asexualmente por endopoligénia (varias células hijas se forman dentro del parásito

progenitor) Esta se puede considerar la forma aguda de la enfermedad que si el hospedero es inmunocompetente es bloqueada por la respuesta celular provocando que la infección se vuelva crónica, a partir de este momento los parásitos invaden lentamente el tejido parenquimatoso manteniendo una infección crónica que permite en determinadas circunstancias la transmisión del parásito hacia la descendencia causando la infección aguda que le puede causar la muerte o bien el animal nace infectado y los eventos posteriores van a depender de su situación inmunológica.

En el hospedador intermediario el parásito se reproduce muy lentamente por endodiogénia (a partir de un individuo se inicia la formación de las membranas de 2 individuos de manera que se intercalan, el núcleo se estrangula y se originan 2 nuevos individuos) formandose bradizoitos, los cuales pueden promover la formación de las colonias terminales (acúmulos de bradizoitos) durante años, pudiendo ocurrir la reactivación de la infección al haber un desbalance de la respuesta inmune del individuo. Miden aproximadamente 7-8 μm y morfológicamente son muy similares, contienen los mismos organelos que el taquizoito³², pero presentan un número menor de roptrias. Las colonias terminales se localizan en el sistema nervioso central, retina, tejidos fetales, bazo, hígado, pulmón, médula ósea, suprarrenales, etc. (zonas pobres en anticuerpos)³⁴⁻³⁷. Las colonias terminales son redondas dentro de cada una de estas se observan de 50 a 500 bradizoitos, su pared es lisa y gruesa³². Estas fases son ingeridas por el hospedero definitivo para reiniciar el ciclo biológico.

Cuadro 1: Ciclo biológico *Neospora caninum*



(Dubey, 2003); cortesía del Dr. J.P. Dubey

2.2.- Epidemiología de la neosporosis.

Aunque la patogénesis de la neosporosis en el bovino es parcialmente conocida, se han logrado importantes avances para comprender los mecanismos involucrados en la muerte fetal o la transmisión vertical, hoy en día se ha demostrado que el parásito puede transmitirse por diferentes vías se cree que la transmisión vertical transplacentaria es el principal mecanismo para mantener la infección en los hatos ^{10,12,18,34}. Investigaciones realizadas por Dijkstra y *Cols.* en 2001 ³⁴ establecieron detalles sobre las rutas naturales de transmisión post-natal de *N. caninum* entre perros y ganado, concluyendo la importancia de los restos placentarios, fetos muertos o líquidos de las descargas postparto, consumidos por los perros, se ha demostrado que los bradizoítos que se encuentran dentro de los quistes presentes en los tejidos, son resistentes a una solución de pepsina y la infección experimental de perros confirma la hipótesis que sostienen que *Neospora caninum* podría transmitirse a otro animal por la ingesta de tejidos que encierran quistes viables. Si bien estos estudios no demuestran en forma concluyente en qué momento los caninos pueden ser hospederos definitivos de *Neospora caninum*, las inoculaciones orales llevadas a cabo en forma experimental, demostraron que los perros son hospederos definitivos. Los ooquistes diseminados por los perros infectados con bradizoítos contenidos en quistes tisulares tienen esporozoítos. Experimentalmente también se ha demostrado la transmisión via calostro ³⁵. La infección postnatal ó transmisión horizontal se produce por la ingestión de alimentos y agua contaminados por ooquistes esporulados, una vez liberados en la luz intestinal, los esporozoítos atraviesan la barrera intestinal para llegar a los tejidos vía sistema linfático y sanguíneo. Al producirse una parasitemia, ya sea por reactivación de quistes latentes o como resultado de una infección oral, los taquizoítos no sólo atraviesan la placenta produciendo necrosis e inflamación sino que acceden a los tejidos fetales por vía sanguínea pudiendo ocasionar la interrupción de la gestación ó la transmisión vertical con el nacimiento de una cría congénitamente infectada ³⁸. Se ha propuesto que transcurren 3 – 4 semanas entre la infección y el aborto ³⁹⁻⁴², mecanismos hormonales e inmunes maternos ocurridos durante la gestación, sumado al desarrollo del sistema inmune fetal actuarían determinando si la infección desencadena la muerte del feto, el nacimiento de un animal congénitamente infectado que en el caso de ser hembra transmitirá la enfermedad a su

descendencia teniendo también alto riesgo de abortar ^{4,10} o el nacimiento de animales infectados en el útero con signos neurológicos y bajo peso al nacimiento ^{19,27} .

Las vacas afectadas no muestran ningún síntoma clínico de enfermedad a excepción del aborto ⁴². No suele haber retención de placenta y la fertilidad después del aborto no parece verse alterada. Los abortos se producen en vacas y novillas a partir de los tres meses de gestación, siendo más frecuentes (78%) entre los 4 y 6 meses, con una media de 5.6 a 5.7 ⁴⁸. No se han descrito abortos en gestaciones de 2 meses o menos, aunque no se puede descartar que puedan producirse muertes embrionarias. Se han descrito abortos por *N. caninum* tanto en ganado productor de carne y lechero, aunque se dispone de más datos sobre ganado lechero; no se cree que exista predisposición racial, sino que la mayor tasa de abortos en ganado lechero estaría relacionada con el manejo, la mayor densidad de animales en explotaciones intensivas y la mayor facilidad de que los alimentos se contaminen con heces del hospedador definitivo. Asimismo, es más fácil que los abortos pasen desapercibidos en ganaderías extensivas. *N. caninum* puede provocar abortos repetidos (3-4) en gestaciones consecutivas o intercalar abortos con gestaciones normales y nacimiento de terneros infectados. Los abortos pueden presentarse de forma endémica, epidémica o esporádica. Los abortos endémicos son aquellos que se presentan a lo largo de varios años y son superiores a las tasas normales. Este tipo de presentación tendría lugar en explotaciones en las que la infección se mantiene por transmisión vertical en ausencia del hospedador definitivo. Los abortos epidémicos o “tormentas” de abortos son aquellos que pueden llegar a un 20-30% en dos semanas, produciéndose en general a mitad de gestación. Se da en explotaciones con escasa o nula prevalencia del parásito, se presentan al entrar en contacto de forma súbita con la explotación. En los meses posteriores se podrán encontrar fetos momificados. Reynolds y Anderson en California 1997 ³⁹ describieron un brote epidémico en el cual abortaron 27 (18%) de 147 novillas en seis semanas. En explotaciones endémicas se podrían observar minitormentas de abortos que estarían relacionadas con alteraciones del sistema inmunitario de los animales causadas por estrés, agentes infecciosos (DVB, IBR, *Brucella sp.*) y contaminación de los alimentos por hongos y toxinas. También podrían estar causadas por nuevas reinfestaciones por vía horizontal. Los

abortos esporádicos se pueden encontrar en explotaciones con bajos porcentajes de seroprevalencia.

La infección fetal por *N. caninum* no siempre produce muerte del feto ^{49,50}. Se pueden observar terneros vivos afectados congénitamente y con sintomatología muy variable; las lesiones en el sistema nervioso central producen cuadros clínicos que a menudo se limitan a disfunciones de las extremidades, que van desde leves déficits propioceptivos, ataxia, disminución del reflejo patelar a parálisis total ^{42,51}. Eventualmente pueden presentar anomalías congénitas como exoftalmia o asimetría ocular ⁴⁸.

2.2.1.- Inmunopatología de *Neospora caninum*

Los protozoarios intracelulares como *N. caninum*, estimulan una respuesta inmune Th1 dominada por la producción de Interleucina 12 (IL-12), Interferón gama (IFN- γ), Factor de necrosis tumoral (FNT) e IgG2⁵³. Estas últimas citoquinas activan algunas vías que generan radicales libres y Óxido nítrico (ON), los cuales son letales para dichos parásitos⁵⁴. Es de suma importancia reconocer, que en la neosporosis se desconoce si la respuesta inmune se comporta de la misma forma en las infecciones causadas por el consumo de ooquistes (transmisión horizontal) y en la que se presenta en infecciones prenatales (transmisión vertical)^{55,56}. Aunado a que se han encontrado evidencias de la variación de los antígenos presentes en los diferentes estadios del parásito (taquizoitos y bradizoitos)^{57,58}. Las investigaciones realizadas para conocer a fondo estas variaciones son de suma importancia para establecer medidas de control más apropiadas⁵⁹.

➤ Respuesta a la infección primaria.

Durante la infección temprana causada por taquizoitos de *N. caninum* los mecanismos desarrollados por la Inmunidad Mediada por Células (IMC) son relevantes para controlar un parásito intracelular obligado, especialmente por su habilidad para evadir la respuesta inmune⁶². El parásito tiene una interacción con neutrófilos, macrófagos y células NK, esto permite una presentación de antígenos por los macrófagos y células dendríticas a células CD4+ y CD8+ de gran potencial citotóxico lo que da lugar a la activación de la respuesta TH1 da lugar a la producción de γ , IL-12 e IL-2, FNT, potenciando la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos lo cual permite la destrucción de taquizoitos, hay muerte de células infectadas por apoptosis, se producen IL4, IL5, IL6 e IL10 como moduladores lo cual produce un viraje de la respuesta inmune a TH2 (humoral).

En algunos experimentos *in vitro* se demostró que el tratamiento de células infectadas con IFN- γ recombinante inhibió la multiplicación intracelular de *N. caninum*⁶³. En otra investigación se determinó que después de 4 a 8 días de la estimulación con el antígeno de

N. caninum las células mononucleares de sangre periférica de los bovinos infectados proliferaron y comenzó la producción de IFN- γ .⁶⁴ Aunque el cultivo primario de células de cerebro bovino es altamente susceptible a la infección por *N. caninum*, la infección puede ser inhibida por adición de IFN- γ y FNT (Factor de Necrosis Tumoral)⁶³. 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 bovinos inoculados experimentalmente a los 140 días de gestación⁶⁴. Desafortunadamente es pobre la información del papel que juegan las citoquinas en la respuesta a las infecciones por *N. caninum* en bovinos. Sin embargo, algunos estudios, indican que los mecanismos asociados a la respuesta Th1 con la producción de IFN- γ e IgG2 serían la forma adecuada para controlar la infección.⁶⁵⁻⁶⁸ Se tendría que investigar más para establecer si este tipo de respuesta resulta negativa durante la preñez. La modulación en la producción de las citoquinas podría ser un mecanismo estratégico para la prevención de la transmisión vertical y el aborto.

La importancia del rol del óxido nítrico (ON) esta basada en que, este metabolito originado a partir de nitrógeno y producido por macrófagos activados, tiene diversas funciones entre las cuales se consideran la inmunosupresión y la destrucción de parásitos intracelulares.⁶⁹ La adición de un inhibidor del ON a células del bazo de ratones infectados estimuló la respuesta IMC específica e inespecífica.⁷⁰ En contraste, ratones deficientes en óxido nítrico sintetizan la enzima que produce ON, son susceptibles a *N. caninum*.^{71,72}.

Al existir una falla en la respuesta a la infección primaria se genera un microambiente rico en citocinas TH2 durante el estado agudo de la infección bloqueando la síntesis de INF- γ potenciando a las células y moléculas no protectoras, no se lleva a cabo el bloqueo de la replicación del parásito, permitiendo que continúe el proceso de replicación del parásito con aparición de lesiones secundarias dando lugar a lesiones generalizadas en diferentes tejidos.

➤ **Respuesta a la infección crónica.**

En animales inmunocompetentes al ocurrir un viraje a TH2 ocurre la activación de células B 3 a 10 días post-infección con producción de IgM dando la activación de la vía clásica del complemento y este mecanismo protege contra reinfecciones destruyendo los parásitos, hay una respuesta inflamatoria que potencia la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos; Posterior a eso comienza la producción de IgG de todos los subtipos predominando IgG1 complementando la activación del complemento, ayudando a la opsonización favoreciendo la fagocitosis, 20 a 30 días post infección comienza la producción de IgA brindando protección a las mucosas asociada a IL10 producidas por células dendríticas y son transferidas en la lactancia. En vacas infectadas natural y experimentalmente la concentración de la IgG tiende a incrementarse al avanzar la infección, lo que ha permitido diferenciar animales con infección crónica reciente⁶¹. Se ha postulado que el desarrollo de anticuerpos específicos probablemente limita la parasitemia y facilita la lisis de los taquizoítos extracelulares. Diferentes estudios realizados en ratones han descrito que luego de la infección por *N. caninum*, los anticuerpos predominantes son del tipo IgG1 siendo bajos o nulos los niveles de IgG2. Sin embargo, similares niveles de IgG1 e IgG2 fueron encontrados luego del desafío experimental con taquizoítos vivos³⁸ concluyendo que si previene de de reinfecciones.

Al existir una respuesta TH2 en una infección primaria nos causaría niveles elevados de IL2 e IL12 dando lugar a la inyección de gránulos con perforinas, granzinas, enzimas hidrolíticas y ON provocando una destrucción indiscriminada de células liberando de sus membranas a organelos, componentes estructurales y contenido citoplasmático acumulándose gran cantidad de neutrófilos destruyendo tejidos y dando como resultado zonas de necrosis.

➤ **Inmunidad, gestación e infección por *N. caninum***

Las infecciones con parásitos *Apicomplexa* tienen efectos nocivos para la gestación. Sin embargo, existen dos posturas controversiales que explican la fisiopatología de aborto causado por protozoos intracelulares. Primero, la gestación favorecida por una respuesta

Th2 compromete la resistencia al parásito ocasionándose parasitemia e infección transplacentaria. Segundo, una eficiente respuesta Th1 hacia el parásito podría comprometer la gestación. Un trabajo reciente que caracterizó la expresión génica de citocinas en fetos y vacas inoculadas a los 110 días de gestación describe que existió un balance entre las respuestas Th1/Th2 ⁶⁵. En dicho estudio se sugiere que la infección del huésped podría ser favorecida por la expresión de IL-4 e IL-10 (respuesta Th2). Los posibles mecanismos por los cuales causan abortos están sustentados en los desbalances entre la respuesta inmune Th1 y Th2 a favor de la primera ⁶⁵. *T. gondii* protozooario con un parentesco cercano tiene un efecto adverso sobre la gestación, sin embargo el aborto está relacionado con el momento en que se da la infección, este parásito no es transmitido congénitamente en mujeres y ovejas crónicamente infectadas ⁷³; sin embargo, especies de roedores como *Mus musculus* y *Apodemus sylvaticus* transmiten el protozoo *T. gondii* en forma vertical cuando poseen quistes tisulares. Roberts y Cols. en 2001 propusieron que la madre puede controlar la infección durante el 1° trimestre debido a que tiene una respuesta Th1 bien establecida, siendo bajos los niveles de progesterona y la respuesta Th2 ⁷³. Por otro lado, la transmisión vertical ocurre durante el tercer trimestre cuando altos niveles de progesterona se asocian a la respuesta Th2 son incapaces de controlar al parásito. En contraste, un trabajo recientemente menciona que la reactivación parasitaria sería espontánea e independiente de la respuesta inmune ⁷⁴. Sin embargo, ese mismo trabajo sugiere que el ambiente presente en la interfase madre-producto favorecería el pasaje de *N. caninum* a través de la placenta. 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 bajos los títulos de IgG1 en este último grupo. En contraste, se ha descrito que títulos bajos de anticuerpos no necesariamente están asociados con una infección reciente por *N. caninum* aunque puede ser un indicador de riesgo de aborto ¹⁷. Investigando la dinámica de anticuerpos en vacas infectadas con *N. caninum* a lo largo de la gestación, Paré y Cols. en 1997 describieron que aquellos animales con altos títulos séricos hacia el final del período de la gestación parían terneros clínicamente normales pero congénitamente infectados. Sin embargo, cuando los títulos séricos se incrementaban durante la mitad de la gestación existían altas probabilidades que se presentara el aborto ^{12,60}. Adicionalmente, en otros estudios se

postuló que la respuesta inmune de vacas gestantes infectadas naturalmente está asociada a la parasitemia, existiendo una elevación en la concentración de anticuerpos 4-5 meses antes del parto ^{37,60}. Se ha sugerido que los estrógenos placentarios incrementados durante la mitad de la gestación bovina tendrían efectos negativos sobre la IMC favoreciendo tanto la reactivación de bradizoítos como también la parasitemia ⁷⁵. Como contraparte, otros autores atribuyen un efecto inmunosupresor debido a los elevados niveles de progesterona existentes desde los primeros meses de la gestación hasta semanas antes del parto ⁷⁶.

La transmisión congénita de *N. caninum* o la ocurrencia del aborto en bovinos está relacionada con el momento de la gestación en que la madre es infectada. En un estudio, las vacas infectadas antes de la gestación no transmitieron la enfermedad a su descendencia. Las vacas infectadas en el 7º mes de gestación parieron productos vivos congénitamente infectados. Por último, en el grupo de vacas infectadas durante el tercer mes de gestación, murieron 5 de 6 fetos ³⁸. Otro trabajo, en el cual hembras bovinas gestantes fueron infectadas con *N. caninum* a los 70, 140 y 210 días de gestación, se determinó una sólida respuesta IMC en los animales desafiados tempranamente ⁵⁸. Todos los animales nacidos de estas vacas resultaron seronegativos y no hubo evidencia de respuesta IMC. Sin embargo, los animales nacidos de hembras desafiadas a los 140 y 210 días de gestación fueron seropositivos y existió una respuesta IMC positiva detectada en sangre periférica, células del bazo y células de ganglios hepáticos, mesentéricos y retro-faríngeos. Estos resultados sugieren que la IMC de vacas gestantes desafiadas durante el 1º tercio de la gestación protege al feto de la infección. Como contraparte, la infección fetal tendría lugar durante el segundo y tercer tercio siendo factible el aborto y el nacimiento de animales congénitamente infectados, respectivamente ⁵⁸.

La infección por *N. caninum*, acompañada por incrementos en los niveles de IFN- γ ha sido postulada como mecanismo fisiopatológico del aborto ³⁸. Otros autores sostienen que la limitada producción de IFN- γ en respuesta a la presencia de IL-10 secretada por las células del trofoblasto, impediría el control de la multiplicación de *N. caninum* durante la gestación ⁷⁷. Asimismo la reactivación de los bradizoítos desde los lugares de latencia podría deberse al descenso de los niveles de IFN- γ ⁷⁷. Estudios realizados en fetos bovinos infectados experimentalmente con *N. caninum* a los 159 y 169 días de gestación, evidenciaron que la IMC determinada por pruebas de linfoproliferación y producción de IFN- γ fue variable

entre los fetos ⁶⁸. En dicho trabajo, no existió correlación entre la respuesta celular y la severidad de las lesiones fetales ⁶⁸. Se encontró que la producción de citoquinas e IFN- γ estuvo asociada a una respuesta celular tipo 1 en 4 de los 5 fetos en estudio ⁶⁸. Además, una respuesta predominantemente tipo 2 fue indicada por la presencia de IgG1 específica a *N. caninum*. Se sugirió que un desbalance entre las respuestas celulares 1 y 2 a favor de la tipo 2 con producción de IL-4 ocurrió en los fetos que tuvieron limitada capacidad para resolver la infección ⁶⁸.

Aunque el número de macrófagos presentes en la interfase madre-producto se incrementa notablemente en el 3° tercio de la gestación, durante dicho período es común el nacimiento de animales congénitamente infectados ³⁸. Recientemente, Maley y *Cols.* 2003 han propuesto que las severas lesiones observadas en la placenta explicarían la patogénesis del aborto causado por *N. caninum* ⁷⁸. Resumiendo, luego que una hembra bovina ingiere ooquistes o sufre una reactivación, los factores que influyen la infección fetal serían el modo de infección de la madre, el momento de la gestación, la respuesta inmune materna y la respuesta inmune del feto ⁷⁹. Así, un balance a favor de una respuesta Th1 durante el primer trimestre de la gestación bovina controlaría la infección pero resultaría nociva en la relación madre-producto. Por otra parte, la modulación a favor de una respuesta inmune Th2 observada en el segundo trimestre de la gestación no permitiría controlar la infección y el parásito ocasionaría lesiones inflamatorias no sólo en la placenta sino también en el feto ⁷⁹. Durante el tercer trimestre se observaría infección congénita siendo menor la probabilidad de observarse un aborto debido a la maduración del sistema inmune fetal ⁷⁹. Considerando que la mayoría de los abortos observados naturalmente ocurren entre el tercer y sexto mes de gestación, la fisiopatología del aborto por *N. caninum* se explicaría por la incapacidad de controlar la infección debido a una respuesta inmune tipo Th2 durante el segundo tercio de la gestación. Asimismo, los abortos durante el primer tercio asociados a una exacerbada respuesta inmune Th1 han sido observados sólo en reproducciones experimentales quedando aún por demostrarse que altos niveles de IFN- γ y bajos niveles de IL4 son suficientes eventos como para causar abortos en el bovino ³⁸. Al respecto, aunque los animales producto de vacas naturalmente infectadas nacieron congénitamente infectados, no se observaron abortos siendo adecuados los niveles de IFN- γ durante el segundo trimestre de la gestación ⁸⁰.

2.2.2.- Diagnóstico.

La neosporosis es reconocida como una importante causa de abortos en bovinos^{72, 81,82}. Por lo que es indispensable diferenciarla de la diarrea viral bovina, rinotraqueitis bovina infecciosa, leptospirosis y brucelosis que han sido reportados como las causas mas frecuentes de aborto en bovinos.

El diagnóstico de la neosporosis se puede realizar de forma individual o integral del hato. El primero considera la infección *in vivo* así como de los fetos abortados y la segunda las características clínicas y epidemiológicas del hato, que permite interpretar el grado de diseminación de la enfermedad, la implicación en los abortos y la elección de medidas preventivas y de control. La información generada de los datos clínicos y epidemiológicos sirve de orientación ante la sospecha de infección y su participación en la presentación de los abortos. Los datos reproductivos de interés son la determinación de abortos en los últimos años, conocer la edad y características del los fetos abortados y si los abortos son de forma endémica (explotaciones que a lo largo de varios años han tenido tasas de abortos superiores a la normal) o epidémica ("tormentas" de abortos que pueden llegar a un 20-30% en dos semanas, produciéndose en general a mitad de gestación, en los meses posteriores podremos encontrar fetos momificados)⁸³. Por lo anterior, los datos clínicos y epidemiológicos hacen sospechar la presencia de la infección por *N. caninum* asociada a la interrupción de la gestación. Sin embargo, el diagnóstico definitivo debe estar basado en el empleo de las técnicas de diagnóstico existentes.

Para el diagnóstico individual *in vivo* o en el feto abortado existe una diversidad de pruebas destacando las inmunodiagnósticas, técnicas histopatológicas, moleculares y de aislamiento *in vitro*^{22,27}. Las pruebas inmunodiagnósticas disponibles son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunoenzimática (ELISA), aglutinación directa, inmunohistoquímica (IHQ), electroforesis combinada con inmunodetección (*Western Immunoblot*)^{22,84}. La histopatología y la IHQ realizadas en tejidos bovinos fetales son técnicas diagnósticas relevantes en las infecciones por *N.caninum*. El diagnóstico presuntivo de aborto por *N. caninum* puede emitirse ante la presencia de lesiones como meningoencefalitis necrosante multifocal, miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía y adenitis focales no

supurativas caracterizadas por la presencia de células mononucleares^{72,81,83,85}. Por medio de la IHQ podemos determinar la presencia del parásito en lesiones de tejidos fetales formolados, aunque su sensibilidad es baja debido a los escasos parásitos presentes en los tejidos ya autolizados, la frecuente contaminación del cerebro de los fetos abortados y la dificultad que presenta al tratar de identificarlo con las técnicas de coloración de rutina, resulta una técnica diagnóstica vigente^{22,83}. Se debe realizar un diagnóstico diferencial con *Toxoplasma gondii*.

Una prueba de fácil acceso en México para el diagnóstico actualmente es la prueba de ELISA, que tiene la capacidad de detectar anticuerpos producto de la infección provocada por el parásito, pero con el inconveniente de que no todo animal que es positivo a la prueba necesariamente abortará o ha abortado por *N. caninum*. Sin embargo, es de gran utilidad cuando se analizan los resultados serológicos positivos obtenidos de animales dentro de un hato y se comparan con los resultados obtenidos para otras enfermedades. La detección de anticuerpos específicos en el suero de la vaca es solamente indicativa de la exposición a *N. caninum* y no es de diagnóstico por sí mismo⁸⁶. Frecuentemente, los resultados que sugieren la neosporosis como causa de aborto, cobran solidez cuando no hay indicios de la acción de otra enfermedad causante de abortos. Es importante analizar la extensión de las lesiones y su incompatibilidad con la vida del feto. Ello se debe al elevado porcentaje de infecciones congénitas en animales nacidos clínicamente normales. Otros protozoarios que causan lesiones semejantes son *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis sp.*⁸⁷⁻⁹⁰.

Los métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos para *N. caninum* e incluyen diversas técnicas de ELISA, aglutinación directa y la inmunofluorescencia indirecta (IFI)⁹¹. Esta última fue la primera de las técnicas utilizadas, empleando como antígeno taquizoitos de *N. caninum*. Se la ha utilizado como la prueba de referencia para el desarrollo de otras técnicas. Existen distintos criterios con respecto a los títulos serológicos considerados positivos ya que es variable el tiempo de seroconversión, luego de una infección. La detección de anticuerpos IGg en líquidos fetales tiene valor diagnóstico.

La Inmunohistoquímica (IHQ) ayuda a identificar los parásitos en los tejidos de fetos abortados y debe sumarse a los resultados obtenidos mediante la histopatología. Esta es una prueba muy laboriosa y su sensibilidad es relativa. Se deben examinar cortes de 3 a 5 áreas del cerebro y de otros tejidos. El hallazgo de algún quiste o acúmulo de taquizoitos, define una infección congénita, pero no la causa del aborto. El reconocimiento de los taquizoitos en los órganos lesionados y la eliminación de otras causas de abortos, asociando la utilización de varias pruebas de diagnóstico permitirá relacionar a *N. caninum* como agente causal ⁹².

La reacción en cadena para la polimerasa (PCR), es una técnica de alta sensibilidad y especificidad, aunque su uso no está tan extendido para el diagnóstico como para la investigación. La prueba de PCR es un valioso auxiliar para la detección de *N. caninum* en tejidos infectados. Se han desarrollado pruebas de inmunotransferencia, con diferentes preparaciones antigénicas, con el fin de reconocer fracciones antigénicas con valor diagnóstico. Por otro lado, el impacto de la técnica de PCR ha sido notable, permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos ^{22, 27,84}. Debido a la alta eficiencia que tiene *N. caninum* para transmitirse en forma vertical, los resultados positivos por IHQ o PCR deberán estar siempre asociados a problemas reproductivos y a la utilización de otras técnicas diagnósticas, no sólo para identificar dicho parásito sino también para descartar otras causas de aborto. El aislamiento de *N. caninum* es difícil y costoso como técnica diagnóstica ⁹³, sin embargo se han logrado aislamientos en muchas regiones ganaderas de todo el mundo ²⁷. El aislamiento de *N. caninum* en cultivos *in vitro* (en cultivos celulares de riñón de bovino y células de cerebro de ratón) permite la caracterización del parásito y es especialmente útil para los estudios epidemiológicos regionales. No es sencillo a partir de fetos abortados, lo que aparentemente depende del grado de autólisis (a la que es muy sensible *N. caninum*) y de la abundancia y distribución del parásito en el tejido seleccionado. También se utiliza para este fin los cultivos *in vivo* a partir de inoculaciones de tejido sospechoso en ratones y otros roedores previa aplicación de 2 inyecciones con 2 a 4 mg. de acetato de metilprednisolona durante 7 días.

2.2.3.- Prevención y control de la neosporosis.

Actualmente a nivel mundial se están desarrollando programas de control y prevención para combatir la neosporosis⁹⁴⁻⁹⁸. El establecimiento de un programa único para controlar y prevenir la neosporosis en todos los hatos, no es real debido a las diferencias epidemiológicas existentes entre regiones. Al empezar a planear cualquier programa de control y prevención debemos incluir un cálculo costo-beneficio, tomando en cuenta que la pérdida económica más importante debido a la infección con *N. caninum* es el fracaso reproductivo, comparados con las pérdidas de beneficios económicos debido a la infección por *N. caninum* o al aborto⁹⁹⁻¹⁰³, a esto deben sumarse los costos directos causados por la pérdida fetal, los costos indirectos donde podemos enmarcar la atención profesional, los gastos asociados al establecer el diagnóstico, la disminución de la producción lactea y los costos de la compra temprana de reemplazos en caso de tener que desechar animales positivos

Una vez analizada esta información debemos tomar la decisión de cuales son las medidas más apropiadas para cada hato. Las medidas de control y prevención en hatos infectados se deben basar en la disminución de la transmisión vertical dentro del hato, en la reducción del número de animales seropositivos y/o en la disminución del riesgo de la transmisión horizontal de *N. caninum*, principalmente mediante el control de la población del hospedador definitivo ya que es fuente de contaminación de agua, pasturas, y bodegas donde se almacena el alimento^{22,94,95,97,102-105}, también es importante recolectar y eliminar fetos abortados y placentas para evitar que se infecte¹⁰⁶.

En rebaños libres las medidas de control y prevención se deben enfocar a evitar la introducción de la infección a través de la implementación de medidas de bioseguridad, mientras que en hatos infectados se han sugerido programas de control que van desde la implementación de nuevas opciones en el manejo reproductivo del ganado, la eliminación de animales seropositivos, la metafilaxia, inmunoprofilaxis y la llamada estrategia "prueba y sacrificio"^{95, 97, 98, 103, 105,107}.

- **Bioseguridad en las explotaciones.**

La implementación de prácticas de manejo que reducen la introducción y difusión de agentes patógenos y sus vectores en una población animal, evitar la entrada de animales infectados en hatos infectados o libres así como evitar o disminuir el riesgo de la transmisión vertical y horizontal entre estas se puede considerar:

1. Cuarentena y selección de lugares libres de la enfermedad para la compra de animales de reemplazo. Todos los animales que sean comprados serán objeto de cuarentena, mediante un aislamiento efectivo del resto del hato, en caso de que algún animal estuviera en ordeño, este se deberá ordeñar en último lugar y sin contacto con otros animales. De igual importancia es la compra de animales, la cual debe realizarse en hatos libres de la enfermedad o de hatos con un excelente historial de eficiencia reproductiva
2. Prevención de la transmisión en los perros y otros posibles hospedadores definitivos. Evitar la contaminación de las praderas y alimentos con las heces. El control de perros en las explotaciones de ganado también se ha propuesto como un mecanismo para reducir la transmisión de la infección para el ganado. En el manejo de hatos lecheros intensivos se debe evitar la presencia de perros. La implementación de medidas adecuadas de higiene en relación a los excrementos de perros en las praderas. En el caso de explotaciones semi o extensivas, el papel de los perros y otros cánidos salvajes como hospedadores definitivos debe ser considerado. La presencia de perros domésticos en las explotaciones podría ser de ayuda al reducir el número de otros cánidos salvajes ¹⁰⁸. El riesgo de la infección de los perros y otros hospedadores definitivos puede disminuir si los fetos abortados, membranas fetales y otros tejidos de animales potencialmente infectados se eliminan de forma segura.

3. Prevención de la transmisión por el agua. Dado que la transmisión por medio de agua de *N. caninum* ha sido demostrada ^{109,110}, se deben practicar las medidas necesarias para prevenir la contaminación del agua por las heces de los hospederos definitivos.

4. Control de roedores. El control regular de roedores es una de las medidas que deben aplicarse para reducir el riesgo potencial de la infección por la ingestión de los mismos por parte del hospedero definitivo, ya los roedores pueden funcionar como reservorios de *N. caninum* ^{111,112}.

5. Prevención de factores desencadenantes de estados de inmunosupresión. La inmunosupresión es causante de la reactivación y liberación de bradizoitos desde los quistes tisulares. Entre los factores capaces de producir inmunosupresión deben aislarse, ciertas micotoxinas en los forrajes mal conservados (moho) y las enfermedades inmunosupresoras como la diarrea viral bovina. . Así como tratar de controlar otros factores que pueden alterar el equilibrio de la inmunidad durante la gestación, tales como el estrés y los desequilibrios de la dieta ¹¹³.

- **Manejo reproductivo.**

Varias medidas de manejo reproductivo se han propuesto para reducir las posibilidades y el impacto económico de la transmisión transplacentaria en los hatos infectados como:

1. La transferencia de embriones obtenidos de madres infectadas a madres receptoras no infectadas pueden prevenir la transmisión transplacentaria de *N. caninum*¹¹⁴. En una investigación realizada por Landmann y *Cols.* en 2002 demostraron que en 70 fetos y/o animales nacidos de vacas seronegativas que recibieron embriones de donantes seropositivos la infección por *N. caninum* no era demostrable, mientras que 5 de 6 terneros procedentes de la transferencia de embriones de donantes seronegativos para receptores seropositivos estuvieron infectadas con *N. caninum*¹¹⁵.
2. Durante la fase de preimplantación los embriones están protegidos contra la invasión por *N. caninum* por la zona pelúcida¹¹⁶. Mediante la utilización de esta técnica se podrían recuperar los animales genéticamente valiosos hijos de madres infectadas con *N.caninum*.
3. La inseminación artificial de animales seropositivos con semen de toros de razas especializadas en la producción de carne. En España López y *Cols.* en 2005 realizaron una investigación en dos explotaciones productoras de leche con seroprevalencia a *N.caninum* del 28%, demostrando que con el uso de semen procedente de razas especializadas en la producción de carne se reduce el riesgo de aborto en vacas lecheras, proponiendo que esto se debe al efecto favorable que brindan las gestaciones de cruce en la función placentaria¹¹⁷.

- **Diagnóstico y Sacrificio.**

Los animales infectados por *N.caninum* deben ser considerados como portadores del parásito y son los probables causantes de que el parásito se propague lentamente a otros animales en el hato por la transmisión transplacentaria o rápidamente por la transmisión horizontal, por ejemplo, a través de la ingestión de alimentos o agua contaminados. Por lo que se tendrá que tomar la decisión de la eliminación del hato de los animales infectados o de su progenie. La eliminación de los animales infectados es una opción eficaz de control pero económicamente poco realista. La estrategia de "prueba y eliminación" incluye las siguientes opciones ¹⁰²:

1. Diagnosticar y sacrificar animales seropositivos.
2. Las pruebas excluyen la progenie de madres seropositivas de la cría

- **Tratamiento.**

Aunque actualmente no existe tratamiento que libere a los bovinos de la enfermedad ¹⁰⁴, existe información acerca de la sensibilidad *in vitro* de *N. caninum* a ciertos antimicrobianos ¹¹⁸. Dichas investigaciones han difundido que utilizando toltrazuril y ponazuril, derivados de la triazinona, (el cual es utilizado en el tratamiento de las coccidiosis en mamíferos), utilizando un tratamiento durante 6 días ¹¹⁹ tuvieron resultados promisorios con una eficacia del 90%. Estos resultados permiten suponer que el 10% restante estaría en riesgo de sufrir una tormenta de abortos o abortos esporádicos. Su posible utilidad en vacas presenta el problema de tener que darse durante 6 días seguidos con un costo de unos 300 dolares americanos por cabeza además del costo adicional de la eliminación de la leche durante 15 días ¹⁰³. La falta de practicidad por la duración del tratamiento y los costos adicionales hacen poco factible este tratamiento en condiciones prácticas para controlar la infección.

En ratones infectados experimentalmente se dio a conocer que tras la aplicación de tratamiento con toltrazuril se podía bloquear la transmisión transplacentaria de *N.caninum*¹²⁰. Sin embargo, un mejor conocimiento de las interacciones que se dan entre el hospedador-parásito durante la gestación nos pueden ayudar a encontrar los períodos estratégicos para la aplicación del tratamiento a corto plazo.

- **Inmunoprofilaxis.**

Idealmente, cualquier vacuna desarrollada contra la neosporosis debe proteger contra las pérdidas fetales y evitar la transmisión vertical. En la búsqueda de una vacuna es importante recordar la información generada por diferentes trabajos experimentales mediante los cuales se sabe que el final del primer tercio de gestación (semana 10), es el momento más apropiado para inducir la muerte embrionaria^{88,121}. Por su parte, la probabilidad del nacimiento de terneros congénitamente infectados aumenta según avanza la gestación. En infecciones naturales, los niveles más elevados de anticuerpos en las vacas que tuvieron terneros congénitamente infectados se han observado entre las semanas 20 y 36 de gestación^{122,123}. Con estos antecedentes es posible idear estrategias de control que permitan inducir una respuesta inmune previa a la gestación para evitar, en alguna medida, el aborto y/o la transmisión de la enfermedad a su descendencia. La vacunación podría ser la herramienta ideal para prevenir la infección exógena. Con base en ello, se están efectuando estudios experimentales con vacunas a base de organismos vivos atenuados en su virulencia las cuales contribuyan a reducir el riesgo de infección en el hato¹²⁴. En un estudio en torno a esto se inmunizaron vacas por vía endovenosa con 107 taquizoitos vivos de la cepa Nowra (que es la que ha demostrado ser menos virulenta) nueve semanas antes de ser inseminadas y se determinó que fueron resistentes al desafío efectuado a los 70 días de gestación mediante la inoculación endovenosa de 107 taquizoitos vivos de *N. caninum* cepa Liverpool. Las crías de las vacas inmunizadas resultaron normales y viables mientras que 5 de 7 vacas del grupo control abortaron. Los primeros ensayos con vacunas a base de organismos inactivados fueron realizados en Estados Unidos^{125,126}, en estos se obtuvo buena respuesta inmune utilizando taquizoitos de *N. caninum* con adyuvantes

sintéticos de los cuales el Polygen fue el que género mejor respuesta ¹²⁷. Cuando vacas infectadas naturalmente con *N. caninum* se inmunizaron con taquizoitos inactivados integrados con Polygen como adyuvante tampoco se pudo prevenir la transmisión vertical de la enfermedad.

Actualmente se comercializa una vacuna inactivada* a base de taquizoitos de *N. caninum* con un adyuvante sintético denominado Polygen la cual se expende en Estados Unidos y otros países. En un ensayo realizado en Nueva Zelanda, la vacuna confirió protección variable (52%-54%) en 2 de 5 hatos ¹²⁸. La misma vacuna utilizada en 25 establecimientos de Costa Rica produjo una eficacia del 46% en 15 hatos ¹²⁹. Se ha sugerido la vacunación como una medida factible de implementar en países donde está permitida su venta ⁹⁵ demostrando un buen porcentaje de protección. Sin embargo, es importante destacar que la vacunación deja títulos residuales de anticuerpos los cuales persisten en el tiempo dificultando el conocimiento del verdadero status de la infección en el hato. En Nueva Zelanda en 2005 World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology informó sobre las condiciones para una vacuna ideal en el control de la neosporosis ⁹⁷ y se enlistan a continuación

- ✓ Proteger contra el aborto, transmisión transplacental o infección general)
- ✓ Haber probado protección eficaz en estudios experimentales efectuados en bovinos
- ✓ Haber probado su eficacia en estudios a campo
- ✓ Contar con una prueba de seguridad (que no sea causante de la enfermedad)
- ✓ Contar con pruebas diagnósticas que permitan distinguir los animales vacunados de los animales infectados (adición de un marcador a las vacunas)
- ✓ Determinar adecuadamente: frecuencia de dosis, vías y momentos de aplicación
- ✓ Deberá garantizar la negatividad de priones de Encefalitis Espongiforme Bovina en los productos utilizados.

*Havlogen Bovilis NeoGuard, Intervet

2.2.4.- Importancia económica.

Actualmente no existe información exacta sobre las pérdidas económicas producto de la infección de *N. caninum* en la industria ganadera, ya que estos reportes están basados principalmente en los abortos, dejando a un lado los demás gastos ocasionados por la infección ¹³⁰⁻¹³². Estimaciones llevadas a cabo en California indican que alrededor de 40,000 abortos pueden asociarse a la infección por *N.caninum* con una repercusión económica de 35 millones de dolares al año para la industria lechera y de 25 millones para industria de carne, cada aborto que se presentará entre el 5 y 6° mes de gestación le costaría a un productor entre 600 -1000 dolares. En Australia y Nueva Zelanda, los reportes muestran que las pérdidas pueden llegar a ser de hasta de 100 millones de dólares australianos por año ¹³³. En Suiza desde el 2001 se decretó como una enfermedad de declaración obligatoria ¹³⁴. Las pérdidas ocasionadas por la neosporosis en un hato de 50 vacas lecheras en Canadá se estima en 2,304 dólares anuales ¹³⁴.

En los Países Bajos se tienen reportes de que el 76% de los hatos seropositivos sin episodios de aborto no tenían pérdidas económicas, mientras que en el 24% restante, las pérdidas económicas se incrementaron notablemente hasta llegar a 2,000 euros anuales. Además en los hatos que presentaron epidemias de abortos, el promedio de costos fue de 50 euros por animal ¹¹³.

En México todavía no se sabe que tanto nos afecta económicamente la neosporosis y solo lo sabremos cuando se establezca un método de diagnóstico eficaz con el cual podamos identificar al parásito en los animales abortados.

En el análisis de los costos producidos por esta enfermedad se deben considerar además de los abortos, las muertes embrionarias, la necesidad de vender vacas infectadas y con alteraciones reproductivas, la disminución de la producción láctea, la disminución del valor de los vientres, la compra de animales de recria más los costos para establecer el diagnóstico ⁹².

2.2.5.- Problemas de salud pública.

En humanos no existen antecedentes de infección con este parásito ¹³⁵. Sin embargo, debido a que dos monos rhesus (*Macaca mulatta*) han sido infectados con éxito con *N. caninum* ¹³⁶, existe la preocupación sobre el potencial zoonótico que pudiera ser subdiagnosticado como toxoplasmosis ¹³⁷⁻¹³⁹.

En México es una enfermedad de notificación mensual obligatoria ante las dependencias oficiales de sanidad animal, se encuentra catalogada dentro del Grupo III: Que está constituido por aquellas enfermedades que se encuentran presentes en territorio nacional pero representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional. Las personas que teniendo conocimiento de la presencia o la sospecha de las enfermedades o plagas dentro de este grupo que no notifiquen a la SAGARPA serán sancionadas conforme a lo dispuesto en la Ley Federal de Sanidad Animal, Norma Oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995, Sistema Nacional de Vigilancia Epizootológica y el Artículo 254 Fracción II del Código Penal para el Distrito Federal en Materia de fuero común y para toda la república en materia de fuero federal.

3.- Hipótesis.

Hay presencia de seropositividad a *Neospora caninum* en el hato bovino productor de leche con antecedentes de aborto.

4.- Objetivo.

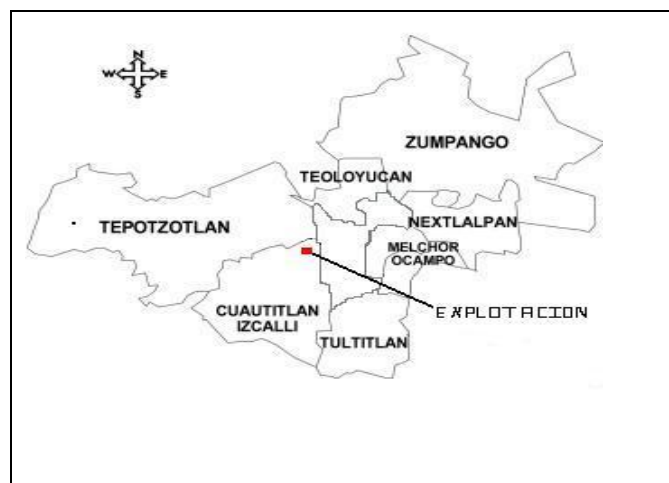
Determinar la presencia de seropositividad a *Neospora caninum* en un hato de bovinos productores de leche con antecedentes de aborto.

Determinar si existe una variación de seropositividad en los 2 grupos analizados.

5.- Materiales y Métodos.

El trabajo experimental se realizó en una explotación localizada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Cuadro 2. El municipio se localiza en la zona noroeste de la cuenca de México. Su cabecera se ubica en las coordenadas 19° 40' 50'' de latitud norte y a los 99° 12' 25'' de longitud oeste. Colinda al norte con los municipios de Tepetzotlán y Cuautitlán, al este con Cuautitlán y Tultitlán, al sur con Tlalnepantla de Baz y Atizapán de Zaragoza, al oeste con Villa Nicolás Romero y Tepetzotlán. Tiene una altura promedio de 2252 metros sobre el nivel del mar, presenta un clima templado subhúmedo con lluvias en verano que van de 600 a 800 mm mensuales¹⁴⁰. Se analizaron 59 muestras de la raza Holstein friesian agrupadas en dos lotes: Vaquillas de reemplazo (n = 25) y Vacas en producción (n = 34). La sangre se colectó de la vena coccígea en tubos vacutainer y se centrifugaron a 1000 g durante 15 minutos, los sueros colectados se almacenaron a 20 grados centígrados hasta su análisis. Para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum*, se utilizó un kit comercial de ELISA*, los sueros se evaluaron por duplicado. Los valores de absorbancia iguales o mayores a 0.5 se consideraron como positivos de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los datos obtenidos del análisis se expresaron en porcentaje y se compararon mediante la prueba de Chi cuadrada (X^2).

Cuadro 2: Ubicación de la explotación.



Fuente INEGI 1990

La metodología de la prueba ELISA: HerdChek*: *Anti-Neospora* es un inmunoanálisis diseñado para la detección de anticuerpos IgG monoclonales contra *N. caninum* en suero bovino, no se han encontrado reacciones de cruce antigénico con otros protozoarios lo que la vuelve una prueba muy valiosa en el establecimiento de un diagnóstico. Se ha creado un formato de microtitulación en el que las placas de 96 pozos se recubren con antígenos de *N. caninum*. Al incubar la muestra de prueba en el pozo recubierto con los antígenos, el anticuerpo contra *N. caninum* forma un complejo. Después de lavar los pozos para eliminar el material no ligado, se añade un conjugado de anticuerpos antibovino peroxidasa de rábano, que se une a los anticuerpos bovinos ligados a los pozos. En el paso final del ensayo, se elimina el conjugado no ligado con un lavado y se añade a los pozos un sustrato de enzima (peróxido de hidrógeno) y un cromógeno tetrametilbencidina 3, 3', 5, 5'. El color que aparece es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

Preparación de las muestras.

- Se diluyeron las muestras a razón de 1:100 con el diluyente para muestra.
- Los controles no se diluyeron.
- Se cambiaron las puntas de las pipetas con cada muestra
- Se registro la posición de cada muestra en la placa utilizando una hoja de trabajo.
- Se mezclaron las muestras antes de dispensar en la placa recubierta con *N. caninum*.

Preparación de la solución de lavado.

- El concentrado de lavado se preparo en cantidad suficiente para todos los lavados
- Se preparó a temperatura ambiente y se agito para asegurarnos de que las sales que se habian precipitado se diluyeran.
- El concentrado para lavado se diluyó a razón de 1:10 con agua destilada/desionizada antes de usarlo (por ejemplo 30 ml. de concentrado más 270 ml. de agua por cada placa analizada.

Desarrollo de la prueba

Todos los reactivos debieron alcanzar la temperatura ambiente antes de usarlos, los reactivos se agitaron suavemente con movimiento circular o en un vórtex a continuación se describen los pasos que se siguieron:

- Se registró la posición de la muestra en la hoja de trabajo.
- Se vertieron los controles negativos en los pozos A1 y A2.
- Se vertieron los controles positivos en los pozos A3 y A4.
- Se vertieron 100 μl . de muestra diluida en los pozos apropiados. Todas las muestras se analizaron por duplicado
- Se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró el líquido de todos los pozos y se desechó en un recipiente adecuado para desechos.
- Se lavó cada pozo 4 veces con aproximadamente 300 μl . de solución de lavado tamponada con fosfato. Se aspiró el líquido de los pozos después de cada lavado. Se evitó que los pozos se secaran entre lavados y antes de agregar el conjugado. Después de la aspiración del último lavado se golpeó la placa suavemente pero firmemente para transferir el líquido residual al material absorbente.
- Se vertió 1 μl de conjugado antibovino en cada pozo (enzima-anti IgG bovina para darle especificidad a la prueba) La enzima utilizada en el conjugado es usualmente peroxidasa de rábano.
- Se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente.

- Se repitieron los pasos 6 y 7.
- Se vertieron 100 μ l. de solución de sustrato cromógeno en cada pozo de la placa.
- Se incubó la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se vertieron 100 μ l de la solución de interrupción (stop) en cada pozo de la placa para detener la reacción
- Se calibró el espectrofotómetro* haciendo una medición con aire.
- Se midió la absorbancia a 630 nm.
- Se calcularon los resultados.

Interpretación de resultados

Para que el ensayo fuera válido, la diferencia (P-N) entre el promedio del control positivo (PC \bar{x}), y el promedio del control negativo (NC \bar{x}) tiene que ser mayor o igual que 0.150. Además, el (NC \bar{x}) debe ser menor o igual que 0,20. Si el ensayo resultara no válido, debe sospecharse que hubo un error en la técnica y debe repetirse el análisis después de leer minuciosamente las especificaciones del producto.

*STATFAX 2100 Awareness Technology Inc.

La presencia o ausencia de anticuerpos contra *N. caninum* se determina al calcular el cociente de la muestra con respecto al control positivo (S/P) para cada muestra. El control positivo se ha normalizado y representa una cantidad considerable de anticuerpos contra *N. caninum* en suero bovino.

- Las muestras de suero con cocientes S/P menores que 0,50 se clasifican como NEGATIVAS hacia los anticuerpos contra *N. caninum*
- Si el cociente S/P es mayor o igual que 0,50, las muestras se clasifican como POSITIVAS hacia los anticuerpos contra *N. caninum*

Cálculos

1. Cálculo del promedio del control negativo (NC \bar{x})

$$NC \bar{x} = \frac{A1 + A2}{2}$$

2. Cálculo del promedio del control positivo (PC \bar{x})

$$PC \bar{x} = \frac{A3 + A4}{2}$$

3. Cálculo del cociente (S/P)

$$S/P = \frac{DO \text{ Muestra} - NC \bar{x}}{PC \bar{x} - NC \bar{x}}$$

6.- Resultados.

En la Tabla 1 se presenta el análisis de resultados de la prueba ELISA: HerdChek*: *Anti-Neospora* dentro de cada uno de los lotes establecidos en el hato de bovinos productores de leche, en donde se determinó una prevalencia de seropositividad igual a 0.5593, una sensibilidad positiva de 0.5758 con un intervalo de confianza (IC) al 95 % (0.3922, 0.7452) y una especificidad de 0.4231 con un IC al 05 % (0.2335, 0.6308).

Lote	Muestras		Negativas		Positivas	
	N	%	N	%	N	%
Vacas en producción	34	57.63	15	25.42	19	32.20
Vaquillas de reemplazo	25	42.37	11	18.64	14	23.73
Total	59	100	26	44.07	33	55.93

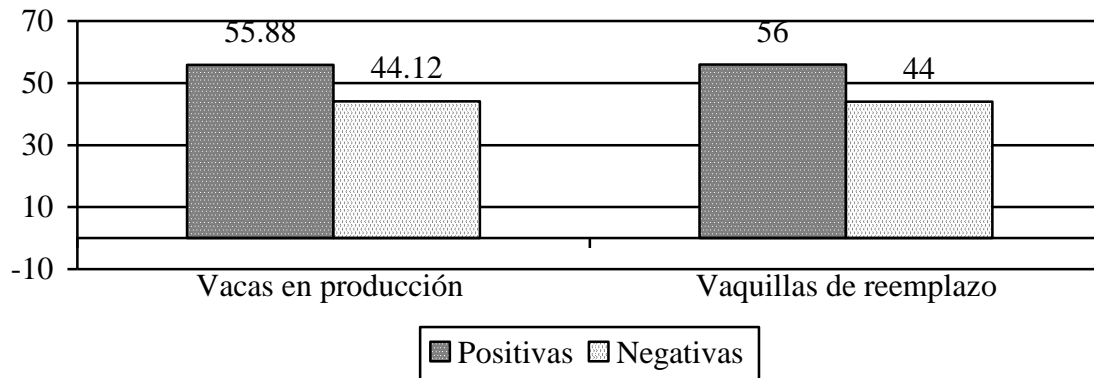
Sensibilidad = Probabilidad de positivos dentro del grupo de positivos.

Especificidad = Probabilidad de negativos en el grupo negativo.

Las diferencias observadas entre las proporciones muestrales de seropositividad a anticuerpos contra *N. caninum* en las vacas en producción y las vaquillas de reemplazo no fueron significativas ($P = 0.993$) (Gráfica 1). Lo que es indicativo que ambos lotes tienen una prevalencia similar de positividad a anticuerpos contra *N. caninum*.

*Laboratorios IDEXX, Inc. Westbrook Maine USA

Grafica 1.- Frecuencias relativas de sueros positivos y negativos a *N.caninum* en vacas en producción y vaquillas de reemplazo.



En la Tabla 2, se presenta la información relacionada con los cálculos requeridos para la determinación del valor de cociente S/P. Los resultados de los valores de cociente S/P para los sueros analizados y la seropositividad se presentan en la Tabla 3. (Grafica 2).

Tabla 2.- Resultados de la determinación de la densidad óptica y cálculos requeridos para la determinación del valor cociente S/P					
	Posición en placa	Densidad óptica (DO) de Absorbancia registrada a 630 nanómetros (nm)	Promedio	\overline{PC} \overline{NC}	Valor considerado en el segundo cálculo (\overline{NC})
1 Control negativo	A1	0.285	$\overline{NC} = 0.279$	0.5875	0.2
2 Control negativo	A2	0.273			
1 Control positivo	A3	0.880	$\overline{PC} = 0.8665$		
2 Control positivo	A4	0.853			

Gráfica 2.- Valores del cociente S/P a anticuerpos contra *N. caninum* obtenidos de la prueba de ELISA HerdChek en vacas en producción y vaquillas de reemplazo.

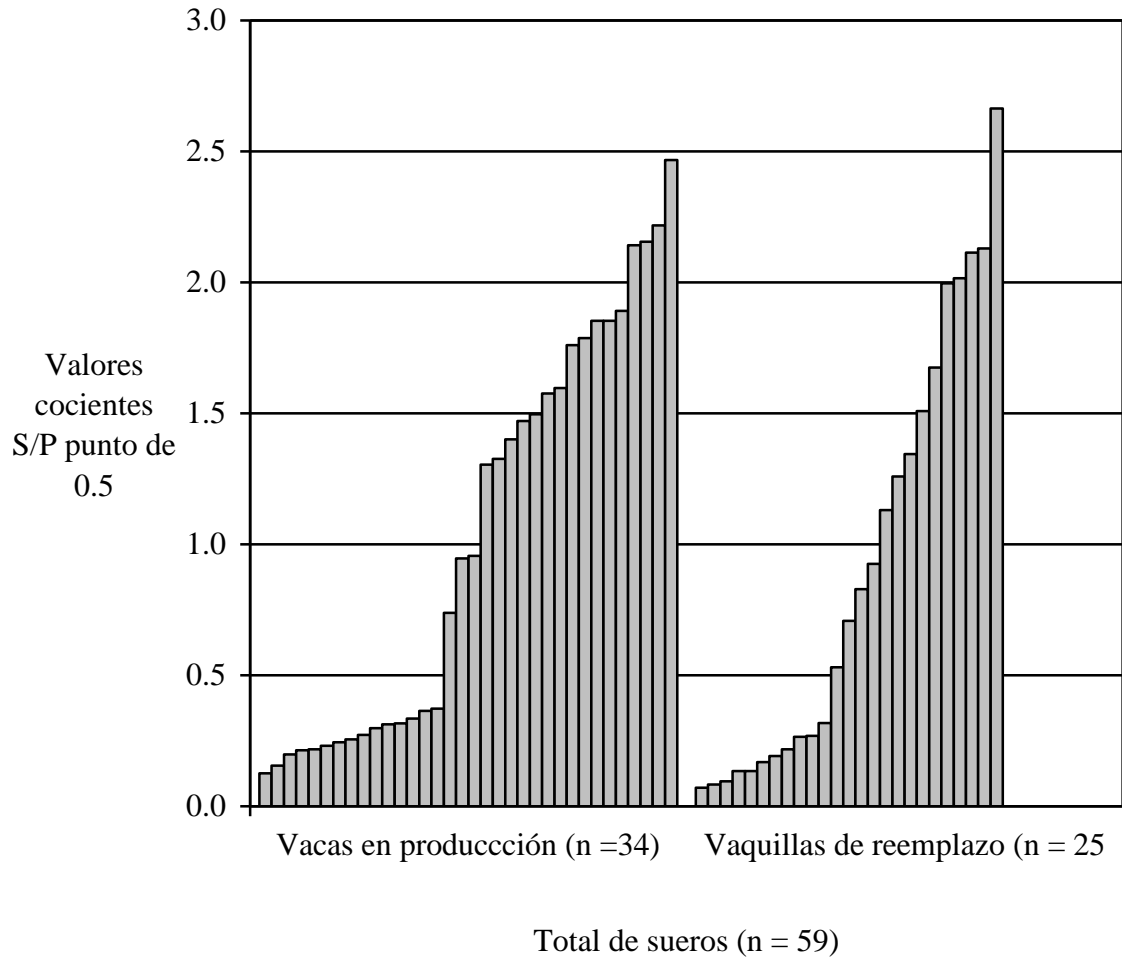


Tabla 3.- Valores del cociente S/P y densidad óptica de los sueros correspondientes a las vacas en producción y vaquillas de reemplazo para la determinación de la seropositividad a anticuerpos contra *N. caninum*

Número de muestra	Valor de cociente S/P		Densidad óptica DO de Absorbancia registrada a 630 nanómetros (nm)	
	Vacas en producción	Vaquillas de reemplazo	Vacas en producción	Vaquillas de reemplazo
1	0.126	0.071	0.274	0.242
2	0.155	0.083	0.291	0.249
3	0.197	0.095	0.316	0.256
4	0.214	0.134	0.326	0.279
5	0.218	0.134	0.328	0.279
6	0.231	0.169	0.336	0.299
7	0.245	0.192	0.344	0.313
8	0.255	0.218	0.35	0.328
9	0.272	0.266	0.36	0.356
10	0.298	0.269	0.375	0.358
11	0.313	0.318	0.384	0.387
12	0.317	0.531	0.386	0.512
13	0.335	0.708	0.397	0.616
14	0.364	0.829	0.414	0.687
15	0.373	0.926	0.419	0.744
16	0.739	1.130	0.634	0.864
17	0.946	1.260	0.756	0.94
18	0.957	1.345	0.762	0.990
19	1.304	1.508	0.966	1.086
20	1.326	1.675	0.979	1.184
21	1.401	1.997	1.023	1.373
22	1.471	2.015	1.064	1.384
23	1.496	2.114	1.079	1.442
24	1.576	2.129	1.126	1.451
25	1.597	2.664	1.138	1.765
26	1.760		1.234	
27	1.787		1.25	
28	1.854		1.289	
29	1.854		1.289	
30	1.891		1.311	
31	2.141		1.458	
32	2.155		1.466	
33	2.218		1.503	
34	2.466		1.649	

$S/P > 0.5 =$ positivas $S/P \leq 0.5 =$ negativas

Cálculo para determinar el valor cociente de cada muestra:

$$(\overline{DO} - \overline{NC}) / (\overline{PC} - \overline{NC}) = \text{Valor del cociente } S/P$$

Muestra 34 de vacas en producción $(1.649 - 0.2)/0.5875 = 2.466$

7.-Discusión.

Los resultados obtenidos de esta investigación nos muestran un alto porcentaje de seropositividad el 55.9%, muy similares a los resultados obtenidos de otras investigaciones realizadas en Aguascalientes por García y *Cols.* 2002; Gutiérrez y *Cols.* 2007 donde concluyeron que la seroprevalencia se estimaba entre el 57% y el 59% a través de dos estudios realizados en diferentes tiempos, encontrando casi el 100% de los hatos positivos ^{134,135}. Al igual que los obtenidos por Medina y *Cols.* 2006 sobre la seroprevalencia a *N. caninum* en hatos lecheros de Aguascalientes donde se reportaron valores mayores o iguales al 50% ¹³³. Todos los resultados anteriores son mayores a los obtenidos por Morales y *Cols.* 2001, utilizando 62 muestras de suero del municipio de Chalco, Estado de México mostraron una seropositividad de 35.4% ⁷. A su vez Salinas y *Cols.* 2005 realizaron estudios sobre la seroprevalencia de anticuerpos contra *N. caninum*, evaluando 591 muestras de hatos bovinos lecheros y de carne del noreste de México (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas) revelaron una frecuencia del 36% ¹³⁶. García y *Cols.* 2005, evaluaron 20 hatos lecheros de Coahuila, Chihuahua, Hidalgo, Querétaro y Jalisco, estimando una seroprevalencia del 42% ¹³⁷. Así mismo Paulin y *Cols.* 2009 en su investigación llevada a cabo en el Estado de Hidalgo reportaron un 46.3% de seropositividad ¹³⁸. La variación de porcentajes de seropositividad puede deberse a las características de cada explotación y de cada región. La seropositividad en los dos grupos es muy similar lo que nos hace sospechar que la transmisión vertical es la forma más importante de transmisión en este hato.

8.-Conclusiones.

En el hato de bovinos productores de leche con antecedentes de aborto analizado se determinó una seropositividad del 55.9 % mediante la prueba ELISA.

Referencias Bibliográficas.

- 1.Houe H. 1995. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. Vet. Clin. North Am.: Food Animal Practice 11: 521-547.
- 2.McGowan M.R.; P.D. Kirkland. 1995. Early reproductive loss due to bovine pestivirus infection. Br. Vet. J. 151: 263-270.
- 3.Brownlie J.; L.B. Hooper; I. Thompson; M.E. Collins. 1998. Maternal recognition of foetal infection with bovine virus diarrhea virus – the bovine pestivirus. Clin. Diagn. Virol. 10: 141-150.
- 4.Wounda W.; Th. Dijkstra; A.M.H. Kramer; C. Maanen; J.M. Brinkhof. 1999 . Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. J. Parasitol. 29: 1677-1682
- 5.Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS and Topper MJ. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission JAVMA 193: 1259-1263.
- 6.Anderson M L, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL and Conrad PA. 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. JAVMA 198:241–244.
- 7.Morales, E., Trigo, J. F., Ibarra, F., Puente, E., Santacruz, M., 2001. Seroprevalence study of bovine neosporosis in México, J. Vet. Diagn. Invest. 13, 413-415
- 8.Boulton JG, Gill PA, Cook RW, Fraser GC, Harper PA and Dubey JP. 1995. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. Aust. Vet. J. 72:119–120.

9. Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, and Kinde H. 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *JAVMA* 207:1206–1210.
10. Paré J, Thurmond MC, and Hietala SK. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60:133–139.
11. Atkinson RA, Cook RW, Reddacliff LA, Rothwell J, Broady KW, Harper P and Ellis JT. 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Aust. Vet. J.* 78:262–266.
12. Paré J, Thurmond MC and Hietala SK. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83:82–87.
13. Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EA and Werven T. 1998. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: A retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriog* 49:1301–1309.
14. Corbellini LG, Driemeier D, Cruz CFE, Gondim LFP, and Wald V. 2002. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet. Parasitol.* 103:195–202.
15. Bergeron NG, Fecteau, Paré J, Martineau R and Villeneuve A. 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Quebec. *Can. Vet. J.* 41:464–467.
16. Davison HC, Otter A and Trees AJ. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int. J. Parasitol.* 29:1683–1689.

- 17.Sager H, Gloor M, Börkman C, Kritzner S, Gottstein B (2003). Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. *Vet. Parasitol.* 112: 1-10.
- 18.Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Anderson, M.L., Davis S.W., Shen S.K. (1992): Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *JAVMA.*201: 709-713.
- 19.Barr B, Bjerkäs I, Buxton D, Conrad P, Dubey J, Ellis J, Jenkins M, Johnston S, Lindsay D, Sibley D, Trees A, Wouda W. 1997 Neosporosis. Report of the international *Neospora* workshop. *Parasitol* 19:120-126
- 20.Cordero M, Rojo F. *Parasitología veterinaria.*1999 McGraw- Hill Interamericana. Madrid, España. 968 pp.
- 21.Stenlund S. *Neospora caninum* in cattle in Sweden. 2000. Thesis doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Suecia. 40 pp.
- 22.Dubey JP. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* ; 41:1-16.
- 23.Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB.1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* ; 82:327-333.
- 24.Dubey JP.1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* ; 84:349-367.
- 25.Dubey JP, Barr B, Barta J, Bjerkäs I, Björkman C, Blagburn B, Bowman D, Buxton D, Ellis J, Gottstein B, Hemphill A, Hill D, Howe D, Jenkins M, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh A, Mattson J, Mcallister M, Modrý D, Omata Y, Sibley L, Speer C, Trees A, Uggla, Upton S, Williams D, Lindsay D.2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol* ; 32:929-946.

26. Gondim L, Mcallister M, Pitt W, Zemlicka D. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 34:159-161.
27. Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. 1996. A review of *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 67: 1-59.
28. Buxton D, Mcallister M, Dubey JP. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in Parasitol* ;18:546- 552.
29. Dubey JP, Zarnke R, Thomas N, Wong S, Van Bonn W, Briggs M, Davis J, Ewing R, Mense M, Kwok O, Romand S, Thulliez P. 2003. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet Parasitol* ; 116:275-296.
30. Atkinson R, Harper P, Reichel M, Ellis J. 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infection of cattle. *Parasitol Today* ;16:110-114
31. Dubey JP. 2003. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 42-56.
32. Dubey JP, Sreekumar C, Knickman E, Miska K, Vianna M, Kwok O, Hill D, Jenkins M, Lindsay D, Green C. 2004. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int J Parasitol* ; 34: 1157-1167.
33. Peters M, Lütkefels E, Heckerroth A, Schares G. 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol* ; 31: 1144-1148.
34. Dijkstra, T. H., Eysker, M., Zares, Conraths, F. J., Wounda, W., Barkema, H.W. 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but no after ingestion of calostrun. Spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *International Journal for Parasitology*; 31:747 - 752.
35. Ugglå A, Stenlund S, Holmdahl O, et al. 1998. *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int. J. Parasitol*, 28: 1467:1472

- 36.Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T. 2000. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet Parasitol.* 90: 247-252.
- 37.Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Uggla, A., Björkman.1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.*85:227-234.
- 38.Williams, D.J.L., Guy, G.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker. L., Smith, R.F., MacEachenr, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F., Trees, A.J. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitol* 121: 347-358.
- 39.Anderson, M.L., Reynolds, J.P., Rowe, J.D., Packham, A.E., Barr, B.C. and Conrad, P.A. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora sp.* infection in dairy cattle. *Am Vet Med Assoc* 210: 1169-1172.
- 40.Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Anderson, M.L., Davis S.W., Shen S.K. 1992. Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *JAVMA.*201: 709-713.
- 41.Hietala, S.K., Thurmond, M.C. 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Parasitol* 29: 1669-1676.
- 42.Barr, B.C., Anderson, M.L., Dubey, J.P., Conrad, P.A.1991. *Neospora* like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 28: 110-116.
- 43.Thellin O, Heinen E (2003) Pregnancy and the immune system: between tolerance and rejection. *Tox.* 185: 179-184.
- 44.Clark DA, Arck PC, Chaouat G (1999) Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am. J. Reprod. Immunol.* 41: 5-22.

- 45.Hill JA, Polgar K, Anderson DJ (1995) T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *J. Am. Med. Assoc.* 273: 1933-1936
- 46.Raghupathy R (1997) Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today.* 18: 478-482.
- 47.Trees, A.; F. Guy; B. Tennant; A. Balfour; J.P. Dubey. 1993. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Vet. Rec.* 132: 125-126.
- 48.González L. Buxton D. Atzaerandio R. Adúriz G. Maley S. Marco J.C. 1999. Abortos en la especie bovina asociados a *Neospora caninum* en el norte de España. *Vet Rec.*
- 49.Thurmond, M.C., Hietala, S. and Blanchard P.C. 1997a. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum* induced. endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diag Inv* 9: 44-49.
- 50.Wouda, W., Moen, A.R. and Schukken, Y.H. 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *N caninum* epidemic. *Theriog* 49:1311-16.
- 51.Dubey JP, Lindsay DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, Thulliez P. 1996. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am J Vet Res.* Mar;57(3):329–336
- 52.Campero CM, Moore DP, Anderson MA, Posso MA. 2000. Diagnóstico de aborto bovino a *Neospora caninum* mediante inmunohistoquímica en rodeos de Argentina. *Memorias del XXI Congreso Mundial de Buiatría, Punta del Este, Uruguay, p. 95.*
- 53.Tizard J. 1992. *Inmunología Veterinaria. Cuarta Edición.*Nueva Editorial Interamericana, S.A. México. p. 280-294.
- 54.Hunter CA, Reiner SL .2000. Cytokines and T cells in host defense. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 413-418

55. De Marez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, Gasbarre L. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int. J. Parasitol.* 29: 1647-1657.
56. Fuchs N, Sonda S, Gottstein B, Hemphill A. 1998. Differential expression of cell surface and dense granule associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *J. Parasitol.* 84: 753-758.
57. McAllister MM, Parmley SF, Weiss LM, Welch VJ, McGuire AM. 1996b. An immunohistochemical method for detecting bradyzoite antigen (BAG5) in *Toxoplasma gondii*-infected tissues cross-reacts with a *Neospora caninum*-bradyzoite antigen. *J. Parasitol.* 82: 354-355.
58. Schares G, Dubremetz JF, Dubey JP, Bärwald A, Loyens A, Conraths JF. 1999. *Neospora caninum*: Identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. *Exp. Parasitol.* 92: 109-119.
59. Marks J, Lundén A, Harkins D, Innes EA. 1998. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol.* 20: 303-309
60. Guy CS, Williams DJL, Kelly DF, McGarry JW, Guy F, Björkman C, *et al.* (2001). *Neospora caninum* in persistently infected pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet. Rec.* 149: 443-449
61. Baszler TV, Long MT, McElwain TF, Mathison BA. 1999. Interferon and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 29: 1635-1646.

62. Hemphill A .1999. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv. Parasitol.* 43: 47-104.
63. Innes EA, Panton WR, Marks J, Trees AJ, Holmdahl J, Buxton D .1995. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H Uracil. *J. Comp. Path.* 113: 95-100.
64. Lundén A, Marks J, Maley SW, Innes EA. 1998. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. *Parasite Immunol.* 20: 519-526.
65. Almeria S, De Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP, Gasbarre LC. 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25: 383-392.
66. Andrianarivo AG, Choromanski L, McDonough SP, Packham AE, Conrad PA .1999. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int. J. Parasitol.* 29: 1613-1625.
67. Packham AE, Sverlow KW, *et al.* .2000. A POLYGENtm -adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Inter. J. Parasitol.* 30: 985-990.
68. Andrianarivo AG, Barr BC, Anderson ML, Rowe JD, Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA. 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol. Res.* 87: 817-825.
69. Tizard J. 1992. *Inmunología Veterinaria. Cuarta Edición.* Nueva Editorial Interamericana, S.A. México. p. 280-294.
70. Khan IA, Schwartzman JD, Fonseka S, Kasper LH. 1997. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp. Parasitol.* 85: 24-34.

71. Tanaka T, Hamada T, Inoue N, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T .2000. The role of CD4+ or CD8+T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 90: 183-191
72. Barr B.C., M.L. Anderson ,P.C. Blanchard, B.M. Daft, H. Kinde, P.A. Conrad. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections, *Vet. Pathol.* 27: 354-361.
73. Roberts CW, Walker W, Alexander W (2001) Sex associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 476
74. Rettigner C, De Meerschman F, Focant C, Vanderplasschen A, Losson B 2004. The vertical transmission following the reactivation of a *Neospora caninum* chronic infection does not seem to be due to an alteration of the systemic immune response in pregnant CBA/Ca mice. *Parasitol.* 128: 149-60.
75. Quinn HE, Ellis JT, Smith NC (2002) *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Parasitol.* 18: 391-394.
76. Innes EA, Wright SE, Maley SW, Rae A, Schock A, Kirvar E, *et al.* (2001a) Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 31: 1523-1534
77. Eperon S, Bronnimann K, Hemphill A, Gottstein B (1999) Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (MT) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 21: 225-236
78. Maley SW, Buxton D, Rae AG, Wright SE, Schock A, Bartley PM, *et al.* (2003) The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J. Comp. Pathol.* 129: 186-195.
79. Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJL, Conrad PA (2002) Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18: 497-504.

80. Moore DP, Leunda MR, Zamorano PI, Odeón AC, Romera SA, Cano A, *et al.* (2005) Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet. Parasitol.* 130: 29-39.
81. Anderson, M.L., P.C. Blanchard, B.C. Barr, J.P. Dubey, R.L. Hoffman, P.A. Conrad 1991. *Neospora*-like protozoan infections as a major cause of abortion in California dairy cattle, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198: 241-244.
82. Patittucci, A.N., W.A.G. Charleston, M.R. Alley, R.J. O'Connor, W.E. Pomroy. 1999. Serological study of a dairy herd with recent history of *Neospora* abortion, *N Z Vet. J* 47: 28-30.
83. Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. 2000. Neosporosis in cattle. *An. Reprod. Sci.* 60-61: 417-431
84. Dubey JP .1999a. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214: 1160-1163.
85. Barr B. C., M. L. Anderson, L. W. Woods, J. P. Dubey, and P. A. Conrad. 1992. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J. Vet. Diagn. Investig.* 4:365–367.
86. Dubey J P., and P. Thulliez. 2005. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. *J. Parasitol.* 91:1217–1218
87. Dubey JP, Lindsay D. 1993. Neosporosis. *Parasitol Today* ; 9:452-458.
88. Williams D, Guy C, Smith R, Guy F, McGarry J, McKay J, Trees. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* ; 33:1059-1065.

89. Wouda W, Bartels C, Moen A. 1995 to 1997. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands. *Theriogenol* 52: 233-245.
90. Schares G, Heydorn A, Cüppers A, Conraths F, Mehlhorn H. 2001. Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. *Parasitol Res* ; 87: 873-877.
91. Bjorkman C., Uggla A. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. for Parasitol.* 29: 1497-1507
92. Dubey J.P y Schares G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.* 140: 1-34.
93. Conrad, P., Barr, B., Sverlow, K., Anderson, M., Dalf, B., Kindle, H., Dubey, J.P., Munson, L., Adams, A. 1993. *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora sp.* from aborted bovine foetuses. *Parasitol*, 106: 239-249
94. Hall, C. A., M. P. Reichel, and J. T. Ellis. 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet. Parasitol.* 128:231–241.
95. Haddad, J. P. A., I. R. Dohoo, and J. A. VanLeewen. 2005. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle—a Canadian perspective. *Can. Vet. J.* 46:230–243.
96. Dijkstra, T., C. J. M. Bartels, and W. Wouda. 2005. Control of bovine neosporosis: experiences from The Netherlands. Session M. Diagnosis and control of protozoan-associated abortion in ruminants, p. 191. 20th Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol., Christchurch, New Zealand, 16 to 20 October 2005.
97. Conraths, F. J., and L. M. Ortega-Mora. 2005. Options for control of protozoal abortion in ruminants: practical experience. Conclusions, p. 229. Workshop Session T. 20th Int. Conf. World Assoc. Adv. Vet. Parasitol. Christchurch, New Zealand, 16 to 20 October 2005.

98. Ortega-Mora, L. M., A. Fernández-García, and M. Gómez-Bautista. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. *Acta Parasitol.* 51:1–14.
99. Bartels, C. J. M., G. van Schaik, J. P. Veldhuisen, B. H. P. van den Borne, W. Wouda, and T. Dijkstra. 2006. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum* associated abortion epidemics. *Prev. Vet. Med.* 77:186–198.
100. Lindsay, D. S., and J. P. Dubey. 1990. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa). *J. Parasitol.* 76:410–413.
101. Hasler, B., K. D. C. Stärk, H. Sager, B. Gottstein, and M. Reist. 2006. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. *Prev. Vet. Med.* 77: 254–283.
102. Larson, R. L., D. K. Hardin, and V. L. Pierce. 2004. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224:1597–160
103. Reichel, M. P., and J. T. Ellis. 2006. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Vet. Parasitol.* 142:23–34.
104. Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. 2000. Neosporosis in cattle. *An. Reprod. Sci.* 60-61: 417-431.
105. Reichel, M. P., and J. T. Ellis. 2002. Control options for *Neospora caninum* infections in cattle—current state of knowledge. *N. Z. Vet. J.* 50:86–92.
106. Thurmond MC, Hietala S. 1995. Strategies to control *Neospora* infection in cattle. *The Bovine Practitioner.* 29: 60-63.

107. Conraths, F. J., G. Schares, L. M. Ortega-Mora, and B. Gottstein. 2007. Control measures: neosporosis, p. 279–287. In L. M. Ortega-Mora, B. Gottstein, F. J. Conraths, and D. Buxton (ed.), *Protozoal abortion in farm ruminants. Guidelines for diagnosis and control*. CAB International, Oxfordshire, United Kingdom.

108. Gondim, L. F. P., M. M. McAllister, N. E. Mateus-Pinilla, W. C. Pitt, L. D. Mech, and M. E. Nelson. 2004. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *J. Parasitol.* 90:1361–1365.

109. Ould-Amrouche, A., F. Klein, C. Osdoit, H. O. Mohamed, A. Touratier, M. Sanaa, and J. P. Mialot. 1999. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet. Res.* 30:531–538.

110. Bowie, W. R., A. S. King, D. H. Werker, J. L. Isaac-Renton, A. Bell, S. B. Eng, and S. A. Marion. 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet* 350:173–177.

111. Huang, C.C., Yang, C.H., Watanabe, Y., Liao, Y.K., Ooi, H.K. 2004. Finding of *Neospora caninum* in the wild brown rat (*Rattus norvegicus*). *Vet. Res.* 35, 283–290.

112. Hughes, J.M., Williams, R.H., Morley, E.K., Cook, D.A.N., Terry, R.S., Murphy, R.G., Smith, J.E., Hide, G. 2006. The prevalence of *Neospora caninum* and co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis in naturally occurring mammal populations. *Parasitol*

113. Bartels, C. J. M., W. Wouda, and Y. H. Schukken. 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenol* 52:247–257.

114. Baillargeon, P., G. Fecteau, J. Paré, P. Lamothe, and R. Sauvé. 2001. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a

method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218:1803–1806.

115.Landmann, J. K., D. Jillella, P. J. O'Donoghue, and M. R. McGowan. 2002. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. Aust. Vet. J. 80:502–503.

116.Bielanski, A., J. Robinson, and B. Phipps-Todd. 2002. Effect of *Neospora caninum* on *in vitro* development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. Vet. Rec. 150:316–318.

117.Lopez-Gatius, F., P. Santolaria, J. L. Yániz, J. M. Garbayo, and S. Almería. 2005. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora* seropositive dairy cows. J. Vet. Med. B 52:88–92.

118.Lindsay, DS, Rippey NS, Cole RA, Parsons LC, Dubey JP, Tidwell RR, Blagburn BL. 1994. Examination of the activities of 43 chemotherapeutic agents against *Neospora caninum* tachyzoites in cultured cells. Am. J. Vet. Res. 55: 976-981

119.Kritzner, S., Sager, H., Blum, J., Greig, G., Gottstein, B. 2002. An explorative study to asses the efficacy of Toltrazuril sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infectedwith *Neospora caninum*. An. Clin. Microbiol. Antimicrob. 1, 4.

120.Gottstein, B., G. R. Razmi, P. Ammann, H. Sager, and N. Müller. 2005. Toltrazuril treatment to control diaplacental *Neospora caninum* transmission in experimentally infected pregnant mice. Parasitol 130:41–48.

121.Macaldowie, C., Maley, S.W., Wright, S., Bartley, P., Esteban-Redondo, I., Buxton, D.,Innes, E.A. 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *Comp. Pathol*, 131, 142-156.

122. Quintanilla, A., Pereira, J., Seijas, A., Costas, E., Ortega, L.M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. in: Hemphill, A. and Gottstein, B (Eds.), A European perspective on *N. caninum*. *Parasitol*, 30, 900-906.

123. Guy, C.S., Williams, D.J.L., Kelly, D.F., McGarry, J.W., Guy, F., Björkman, C., Smith, R.F., Trees, A.J. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec*, 149, 443-449.

124. Guy, C.S., Williams, D.J.L., Smith, R.F., Trees, A.J. 2005. Vaccination against *Neospora*-associated abortion in cattle. In: Proceedings of the 20th International Conference of the World Association for the Adv. of Veterinary Parasitology, Christchurch, p.191.

125. Andrianarivo, A.G., Choromanski, L., McDonough, S.P., Packham, A.E., Conrad, P.A. 1999. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int J Parasitol*, 29, 1613-1625.

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

127. Andrianarivo, A. G., Anderson, M.L., Rowe, J. D., Gardner, I.A., Reynolds, J.P., Choromanski, L., Conrad, P.A. 2005. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitol. Res.* 96, 24-31.

128. Heuer, C., Nicholson, C., Russell, D., Weston, J. 2003. Efficacy of vaccination against *Neospora caninum* for the prevention of abortion in New Zealand dairy cattle. Conference

of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. New Orleans, USA.

129.Romero, J.J., Perez, E., Frankena, K. 2004. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rica dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol.* 123, 149-159.

130.Antony, A., and N. B. Williamson. 2001. Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. *N. Z. Vet. J.* 49:42–47.

131.Trees, A. J., H. C. Davison, E. A. Innes, and J. M. Wastling. 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 29:1195–1200

132.Brittain R. 2000. A review of current reports on bovine neosporosis. *Association Europeenne Transfert Embryonnaire.Newsletter.* 11: 8-10

133.Barr, B. C., J. P. Dubey, D. S. Lindsay, J. P. Reynolds, and S. J. Wells. 1998. Neosporosis: its prevalence and economic impact. *Comp. Cont. Edu. Pract. Vet.* 20:1–16.

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

135.Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Björkman C, Ugglå A. 1999. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. *Emerg Infect Dis* ; 5: 278-2.

136.Basso, W., L. Venturini, M. C. Venturini, P. Moore, M. Rambeau, J. M. Unzaga, C. Campero, D. Bacigalupe, and J. P. Dubey. 2001. Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J. Parasitol.* 87:906–907)

137. Tranas J, Heinzen R, Weiss L, Mcallister M. 1999. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology ; 765-767.
138. Hasler, B., K. D. C. Stärk, H. Sager, B. Gottstein, and M. Reist. 2006. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. Prev. Vet. Med. 77: 254–283
139. Bjerkås, I., S. F. Mohn, and J. Presthus. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd. 70:271–274.
140. Cuaderno Estadístico Municipal, INEGI edición 1990.
141. Medina EL, Cruz C, Quezada T, Morales SE, García VZ. 2006. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. Vet. Parasitol. 136: 187-191.
142. García Z, Cruz C, García TD, Medina EL, Chavarría B. 2002. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, México. Vet Parasitol 106:115-120
143. Gutiérrez G.J, Cruz C, Medina EL, Valdivia FA. 2007. Factores de manejo asociados con la seroprevalencia a la infección por *Neospora caninum* en ganado lechero de Aguascalientes, México. Vet. Mex. 38: 261-270
144. Salinas M J.A, Mora G J, Zarate R J, Riojas V V, 2005. Frequency of *Neospora caninum* antibodies in cattle from northeastern Mexico Vet Parasitol

145.García Z, Rosario CR, Ramos AA, Cruz C, Mapes SG. 2005. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. Vet. Parasitol 134: 61-65

146.Paulin ON1, Osnaya GF2, Galina HM2, Díaz MG2, Urbietta G3, Ocampo LJ1, Acosta SR1 y García PB1 ,2009. Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos de traspatio del Estado de Hidalgo. 1Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia ICAP-UAEH. 2Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM. 3Dirección General de Ganadería del Gobierno del Estado de Hidalgo Congreso de buiatría 2009