

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



NEOSPOROSIS EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

POR

EMMA EDITH BETANZOS ZARATE

MONOGRAFÍA

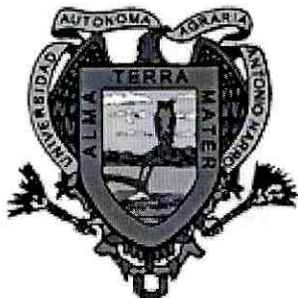
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



NEOSPOROSIS EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

POR

EMMA EDITH BETANZOS ZARATE

**MONOGRAFÍA QUE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
TÍTULO DE:**

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

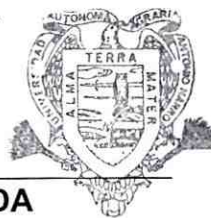
APROBADA POR



**MC. JOSE LUIS CORONA MEDINA
PRESIDENTE DEL JURADO**



**M.V. Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UE

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

SEPTIEMBRE DE 2004

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

NEOSPOROSIS EN LOS ANIMALES DOMÉSTICOS

**MONOGRAFÍA QUE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H.
JURADO EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESIDENTE DEL JURADO



MC. JOSE LUIS CORONA MEDINA

VOCAL



DR. RAFAEL RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

VOCAL



M.C. GERARDO ARELLANO RODRÍGUEZ

VOCAL



M.V.Z. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE

Dedicatorias

A Dios

Porque en todo momento está conmigo y cada día me da la oportunidad de vivir y disfrutar de la compañía de mis seres queridos.

A mis padres: Araceli Zárate López y Catalino Betanzos Betanzos

Porque gracias al apoyo incondicional, al esfuerzo incansable y sobre todo por su cariño y comprensión brindadas durante mi desarrollo profesional pude terminar satisfactoriamente una de las etapas más importantes de mi vida.

Gracias por enseñarme el camino a la superación.

A mis hermanos: Emmanuel, Vicente y Elide Araceli:

Porque son parte de mi vida y a quienes agradezco su apoyo en todo momento

A mis padrinos: Ignacio y Dora Elia

Por los consejos que me dieron y el apoyo recibido durante toda mi vida. Gracias.

A Fabián:

Porque además de ser un compañero, novio, eres un excelente amigo que me brindó su confianza, respeto y compañía durante mi estancia en la Universidad

A mis tíos y primos

Por ser ante todo mis familiares a quienes aprecio y quiero mucho

A mis abuelos:

Ranulfo: que aunque ya no está conmigo, lo seguiré recordando y agradeciendo por todo lo que hizo por mí.

Herlinda: Por tu apoyo brindado cuando lo necesité

A mis amigos:

Roxana, Karen, Fernando Antonio, Lucelly, Carolina, Jesús Manuel, Isael Gustavo, Aurelio, Prisci, Uziel, Omar, Balam, Yadira, Rafael

Agradecimientos

*A mi Alma, Terra, Mater:
UAAAN- UL*

Por el tiempo y espacio que me brindaste, porque gracias a ti recibí una formación que durará toda la vida y que me permitirá aplicar esos conocimientos con éxito.

Al Dr. Jesús Heraclio del Río

Por ser una de las personas que en algún momento del transcurso de mi carrera profesional me dio consejos de gran valor.

A la MVZ. Hortensia Cepeda E.

Por brindarme su apoyo en el ámbito profesional y dedicarme su valioso tiempo para llevar a cabo este trabajo.

A mis asesores:

Mc. José Luis Corona Medina

Dr. Rafael Rodríguez M.

Por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo y por sus sabios consejos que me han brindado a lo largo de mi estancia en esta Universidad.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
3.	ETIOLOGÍA	6
4.	TAXONOMÍA	7
5.	MORFOLOGÍA	8
6.	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	9
7.	CICLO BIOLÓGICO	10
8.	TRANSMISIÓN	12
9.	MODELO ANIMAL	14
10.	DIFERENCIACIÓN ENTRE NEOSPOROSIS Y TOXOPLASMOSIS	15
11.	DIFERENCIACIÓN CON HAMMONDIA SPP	17
12.	DIFERENCIACIÓN CON SARCOCYSTIS SPP	19
13.	HOSPEDEROS INTERMEDIARIOS	19
13.1.	NEOSPOROSIS EN GANADO	19
13.1.1.	Signos clínicos	20
13.1.2.	Prevalencia	22
13.1.3.	Diagnóstico	24
13.1.4.	Lesiones	35
13.1.5.	Patogénesis y aborto	36
13.1.6.	Respuesta inmunológica a la infección con Neospora	38
13.1.7.	Diagnóstico diferencial	40
13.1.8.	Epidemiología en el ganado	41
13.1.9.	Impacto económico	42
13.2.	NEOSPOROSIS EN OTRAS ESPECIES	43
13.3.	BÚFALOS DE AGUA	44
13.4.	OVEJAS	45
13.5.	CABRAS	46
13.6.	CABALLOS	46
13.7.	HUMANOS	47
13.8.	GATOS	48
13.9.	FAUNA SILVESTRE	48
14.	HOSPEDERO DEFINITIVO	50
14.1.1.	Prevalencia y distribución	51
14.1.2.	Epidemiología	52
14.1.3.	Signos clínicos	52
14.1.4.	Diagnóstico	53
14.1.5.	Prevención y control	55
14.1.6.	Tratamiento	56

15.	NEOSPORA HUGHESI COMO NUEVA ESPECIE	56
15.1.	MORFOLOGÍA	57
15.2.	LESIONES	57
15.3.	CICLO BIOLÓGICO	58
15.4.	MODELO EXPERIMENTAL	58
15.5.	SIGNOS CLÍNICOS	58
16.	CONCLUSIONES	58
17.	GLOSARIO	59
18.	REFERENCIAS	63

índice de cuadros y figuras

Cuadro 1. Progreso histórico del conocimiento sobre <i>N. caninum</i>	7
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i>	13
Figura 2. Quistes tisulares de <i>T. gondii</i> y <i>N. caninum</i>	19
Figura 3. Quistes y ooquistes de <i>T. gondii</i> y del género <i>Hammondia</i>	22

1. Introducción

Las infecciones más importantes que pueden causar aborto en el ganado bovino son: brucelosis, campilobacteriosis, leptospirosis, listeriosis, rinotraqueítis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, clamidiasis, tricomoniasis y en los últimos años neosporosis. Además de estas causas específicas se pueden aislar hongos y otros agentes bacterianos (Andrianarivo *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 2002).

La neosporosis es causada por un protozooario parásito *Apicomplexa* formador de quistes, *Neospora caninum*, que actualmente se reconoce como una causa importante de mortalidad en perros (Dubey *et al.*, 1998a) y en muchos países es la principal causa de aborto y de animales nacidos muertos en bovinos productores de leche y de carne (Bae *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2003; Stoessel *et al.*, 2003).

Este parásito tiene un amplio rango de hospederos mamíferos, los cuales se mencionarán posteriormente, y respecto a su transmisión, hay varias formas por las cuales los bovinos y otros hospederos susceptibles adquieren la infestación, esta puede ser: trasplacentaria o vertical; y horizontal como la infección postnatal o congénita con taquizoítos de *N. caninum* (Anderson *et al.*, 2000; Dijkstra *et al.*, 2001a; Dubey, 2003b; French *et al.*, 1999); a través del calostro o leche, ya sea en forma natural o experimental (Anderson *et al.*, 2000; Antony, 2001; Dubey, 2003b; Dubey *et al.*, 1999b; Reichel, 2000; Schares *et al.*, 2001), de igual manera por la ingestión de alimentos y agua contaminados con las heces fecales del hospedero definitivo que contengan ooquistes (Dubey, 1999b; Schares *et al.*, 2001; Toolan, 2003; Uchida *et al.*, 2003), pero no se manifiesta de vaca a vaca o no se sabe que ocurra de esta forma (Dubey, 1999b, 2003b; Toolan, 2003).

En un hato, tanto la transmisión horizontal como la vertical juegan un papel importante en el mantenimiento de la infección por *N. caninum* (Antony, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002) por generaciones con gran eficiencia (Andrianarivo *et al.*,

2000; Dubey, 1999b; Dubey *et al.*, 1999a; Kobayashi *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 1999; Toolan, 2003).

Hay varias pruebas de diagnóstico disponibles para determinar el aborto en bovinos, cada una de éstas tiene sus ventajas y sus limitaciones (Jenkins *et al.*, 2002), como la Prueba de Fluorescencia Indirecta (IFA), la prueba de Western Blot (Baszler *et al.*, 2001; Maley *et al.*, 2001), la Prueba de Aglutinación de Neospora (NAT) (Baszler *et al.*, 2001; Dubey, 2003a), las pruebas ELISA, avidéz de anticuerpos o inhibición competitiva con anticuerpos monoclonales específicos para el parásito (Atkinson *et al.*, 2000; Baszler *et al.*, 2001; Maley *et al.*, 2001), la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes Indirecta (IFAT), y el análisis de Inmunoblot (Atkinson *et al.*, 2000; Dubey, 2003a; Maley *et al.*, 2001).

Respecto al impacto económico, este depende de los costos indirectos, así como del valor por las pérdidas de los fetos. Los costos indirectos incluyen la ayuda profesional y los costos asociados con establecimientos del diagnóstico, el proceso de la gestación, el incremento en el tiempo de lactación, las posibles pérdidas en la producción de leche y los costos de reemplazo de las vacas que abortaron (Dubey, 1999b, 2003b).

Se debe prevenir que los perros coman las placentas para evitar la infección por *N. caninum* lo cual puede provocar la dispersión de los ooquistes, los que representan una fuente de infección horizontal para los bovinos y otras especies de animales susceptibles (Dijkstra *et al.*, 2001b); ya que hasta ahora, no hay medicamentos ni vacunas probadas para eliminar o destruir los quistes tisulares de *N. caninum* (Dubey, 1999a).

Las sulfonamidas, piretamina y clindamicina son fármacos que se han usado con resultados alentadores y que pueden ser utilizados para el tratamiento de la neosporosis canina (Dubey, 1999b; Dubey *et al.*, 1998a).

Recientemente, otra especie *Neospora hughesi* se ha propuesto como parásito que afecta al caballo (Dubey, 1999b, 2003b) aunque Walsh, (2000) lo reportan desde 1998 como causa de la mieloencefalitis equina (EPM).

2. Antecedentes

La neosporosis es una enfermedad ya conocida; estudios retrospectivos han mostrado que varias enfermedades debidas a *N. caninum* se encontraron en un grupo de perros en Estados Unidos en 1957 (Dubey, 1999a, 2003b; Dubey *et al.*, 1999a), aunque se considera que en realidad fue reconocida por primera vez en una camada de perros en Noruega por Björkas *et al.*, 1984 (Dubey, 1999a, 2003a, b; Kim *et al.*, 2002a; Maley *et al.*, 2001; Reichel, 2000), quienes la identificaron como una enfermedad neurológica (Dubey, 1999a), mientras que en bovinos se reconoció en 1988 (Kim *et al.*, 2002a).

A partir de 1980, se describió la infección tanto en los bovinos productores de carne como el de leche (Reichel, 2000) y la descripción de un nuevo género y especie intracelular ahora conocida como *N. caninum*, que es un protozooario estrechamente relacionado con *T. gondii*, la hicieron Dubey *et al.*, en 1988. Desde entonces la neosporosis es conocida como una enfermedad seria del ganado y de los perros en todo el mundo (Dubey, 1999a, 2003b; Maley *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 1999; Reichel, 2000).

N. caninum tiene un amplio rango de hospederos mamíferos, como los perros, los bovinos, las cabras, los caballos y las ovejas en los que causa una seria enfermedad neurológica y muscular, reportada desde 1988 (Antony, 2001; Bae *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 1998b; Kim *et al.*, 2002a; Nishikawa *et al.*, 2002b; Petersen *et al.*, 1999), pero la cual había sido mal diagnosticada como *T. gondii* debido a la existencia de similitudes morfológicas y biológicas de taquizoítos entre las dos coccidias y su amplio rango de hospederos ubicuos (Antony, 2001; Dubey, 1999a; Nam *et al.*, 1998; Nishikawa *et al.*, 2001; Packham *et al.*, 1998). Además, se ha

reportado neosporosis clínica en ciervos, rinocerontes y se han encontrado anticuerpos a *N. caninum* en suero de búfalos de agua, zorras rojas y grises, coyotes, camellos y felinos (Dubey, 2003b).

Para Dubey, el año de 1988, estuvo lleno de acontecimientos debido al descubrimiento, nombramiento y cultivo in vitro del parásito protozoario *N. caninum* y el desarrollo de pruebas serológicas para distinguir a *N. caninum* y su relación con el parásito *T. gondii* (Dubey, 1999a).

La neosporosis bovina se reconoció inicialmente en 1989 y ahora se reporta como la principal causa infecciosa de fallas reproductivas en el ganado lechero en los países del mundo (Baszler *et al.*, 1999).

En el cuadro 1, Dubey (1999a) resume el progreso histórico del conocimiento sobre *N. caninum* a partir de la primera investigación realizada en 1988

Cuadro 1. Progreso histórico del conocimiento sobre *N. caninum*

Contribución	Referencia
1.- La enfermedad fue reconocida por primera vez en perros, pero no se le dió un nombre específico	Bjerkas et al.,1984
2.- Un nuevo género <i>Neospora</i> y tipos de especie. <i>N. caninum</i> se propone para el protozoario de los perros en los Estados Unidos.	Dubey et al.,1998
3.- Se aísla <i>N. caninum</i> en cultivos celulares de ratón y se cumple el postulado de Koch.	Dubey et al.,1988
4.- Prueba de anticuerpos fluorescentes desarrollado para diagnóstico serológico de la Neosporosis.	Dubey et al.,1988

5.- Se desarrolla la prueba de inmunohistoquímica para identificar a <i>N. caninum</i> en los tejidos.	Lindsay y Dubey, 1989
6.- Se identifica a la neosporosis como la causa de los abortos en el ganado lechero.	Thilstein y Dubey, 1989
7.- Se induce la transmisión trasplacental de <i>N. caninum</i> en los perros, los gatos, las ovejas y los bovinos.	Dubey y Lindsay 1989; 1990; 1992
8.- Los modelos experimentales utilizados para desarrollar la neosporosis son los ratones y ratas.	Lindsay y Dubey 1989; 1990
9.- Cobertura de medicamentos para quimioterapia de la neosporosis.	Lindsay y Dubey 1989; 1990
10.- En Noruega, el parásito de los perros se identificó como <i>N. caninum</i> .	Bjerkas y Dubey, 1991
11.- Neosporosis se conoce como la causa principal de aborto en bovino de California.	Anderson et al.,1991; Barr et al.,1991
12.- Se aísla Neospora de fetos bovinos abortados y se induce la enfermedad en ganado.	Conrad et al.,1993; Barr et al.,1994
13.- Se demostró que <i>N. caninum</i> puede ser una infección asintomática común en ganado lechero	Paré et al.,1994
14.- Se desarrolló ELISA para el diagnóstico de neosporosis en perros y el ganado.	Björkman et al.,1994; Paré et al.,1995; Dubey et al.,1996
15.- Primeras proteínas recombinantes de <i>N. caninum</i> producidas para	Lally et al.,1996

diagnóstico.	
16.- Es desarrollada la Prueba de aglutinación directa para el diagnóstico de la neosporosis en varios hospederos.	Romand et al.,1998; Pakham et al.,1998
17.- Se propone una especie distinta <i>N. hughesi</i> para un equino que se aisló basándose en diferencias moleculares.	Marsh et al.,1998
18.- En los bovinos y los caninos el aislamiento del género <i>Neospora</i> se considera que es el mismo organismo.	Mc Allister et al.,1998

3. Etiología

La neosporosis, como ya se mencionó anteriormente, es una infección causada por el protozooario *N. caninum* (Dubey, 2003a; Guarino *et al.*, 2000), el cuál está estrechamente relacionado con el *T gondii*, con el cual había sido previamente confundido (Bjorkman *et al.*, 1999; Collantes *et al.*, 2002; Guarino *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002b; Stenlund *et al.*, 1999).

N. caninum es el principal patógeno del ganado productor de leche y de carne, de perros y ocasionalmente causa infecciones clínicas en caballos, cabras, ovejas, ciervos (Bjorkman *et al.*, 1999; Canon *et al.*, 2003; Dubey, 2003b) camellos y búfalos (Dubey, 2003a; Dubey *et al.*, 1999a), por lo que las infestaciones son comunes en una gran variedad de animales domésticos y silvestres (Toolan, 2003).

En el mundo, *N. caninum* es una causa importante de aborto infeccioso en el ganado (Ahn *et al.*, 2003; Andrianarivo *et al.*, 2000; Bjorkman *et al.*, 1999; De Marez *et al.*, 1999; Dijkstra *et al.*, 2001a; Dubey *et al.*, 1999a; French *et al.*, 1999; Fujii *et al.*, 2001; Jenkins *et al.*, 2002; Jenkins *et al.*, 1997; Sager *et al.*, 2001; Toolan, 2003), de becerros débiles al nacimiento o nacidos muertos (Bjorkman *et al.*, 2000; Bjorkman *et al.*, 1997).

La neosporosis está muy difundida y causa abortos, morbilidad neonatal, mortalidad fetal y neonatal en ganado bovino, ovejas, cabras, ciervos, caballos, además de desórdenes neurológicos y musculares (parálisis) en becerros, y en perros que conllevan a la muerte en el ganado joven y en otros animales de compañía (Dijkstra *et al.*, 2001a; Dubey *et al.*, 1999a; Dubey *et al.*, 1998b; Gennari *et al.*, 2002; Guarino *et al.*, 2000; Howe *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002b; Lally *et al.*, 1996; Nishikawa *et al.*, 2002a; Nishikawa *et al.*, 2002b; Son *et al.*, 2001; Toolan, 2003; Uchida *et al.*, 2003). Sin embargo, los perros y el ganado son las especies más susceptibles a esta enfermedad (Guarino *et al.*, 2000).

Los perros son los únicos hospederos definitivos que se conocen para *N. caninum*, que es uno de los muchos parásitos que transmiten eficientemente al ganado principalmente a vaquillas, ya que más del 90% de las infectadas son estas (Dubey, 2003b). Esta coccidia hasta el momento no ha sido encontrada en humanos pero se ha reportado que puede infectar a monos en forma experimental (Nam *et al.*, 1998).

4. Taxonomía

Nombre común: *Neospora*

Reino: *Protista*

Phylum: *Protozoa*

Clase: *Apicomplexa*

Orden: *Eucoccidiida*

Familia: *Sarcocystiidae*

Género: *Neospora*

Especie: *N. caninum* y

N hughesi

N. caninum es un parásito intracelular obligado (Packham *et al.*, 1998; Schares *et al.*, 1999) originalmente identificado en tejidos de perros, ganado, ovejas, cabras y

caballos con desórdenes neurológicos y musculares (Bae *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 1999).

En estudios retrospectivos, *T. gondii* al igual que *N. caninum* están clasificados dentro del Phylum *Apicomplexa*; subphylum *Sarcodina*; familia: *Sarcocystidae* de las coccidias (*Apicomplexa*; *Sarcocystidae*; *Toxoplasmatidae*) (Dijkstra *et al.*, 2001a; Dubey, 2003b; Guarino *et al.*, 2000; Packham *et al.*, 1998; Tranas *et al.*, 1999). Ambos parásitos tienen una estrecha relación la que además de ser determinada por diferencias ultraestructurales y genéticas, los ooquistes son eliminados por los perros en lugar de los gatos (Dubey, 2003b; Guarino *et al.*, 2000; Packham *et al.*, 1998; Tranas *et al.*, 1999).

5. Morfología

Los taquizoítos de *N. caninum* son de aproximadamente 6 X 2 μm (micras) (Dubey, 1999b, 2003b), y sus quistes tisulares son de forma redonda u ovalada midiendo arriba de 107 μm de longitud y encontrándose principalmente en el sistema nervioso central, incluyendo a la retina (Dubey, 1999b). En perros infectados experimentalmente, los quistes tienen un tamaño de 11.7 x 11.3 μm (Dubey, 2003b). Muchos quistes tisulares tienen un diámetro de 30 μm aunque algunos llegan a medir hasta 107 μm y se pueden separar de cerebro de ratón homogeneizado usando el gradiente de Percoll (Dubey, 1999b).

Las paredes de los quistes tisulares miden 4 μm de espesor y encierran a los bradizoítos de 78 x 2 μm (Dubey, 1999b, 2003b). La pared delgada mide 0.3 a 1 μm y se ha reportado recientemente en los músculos de perros y ganado que se ha infectado naturalmente con parásitos relacionados a *N. caninum* (Dubey, 2003b). Por otra parte, los ooquistes de *N. caninum* son de 10 a 11 μm de diámetro y son morfológicamente similares a los de *Hammondia heydorni* encontrada en heces fecales de caninos y *T. gondii*, *Hammondia hammondi* de heces fecales de gato (Dubey, 1999b, 2003b).

Para determinar una base morfológica, los estadios de *N. caninum* poseen un organelo secretor típico para los *Apicomplexa*, por ejemplo: gránulos densos (Schaes *et al.*, 1999).

6. Distribución geográfica

Actualmente, *N. caninum* es un parásito que se encuentra distribuido en todo el mundo y se reconoce como una de las principales causas de abortos (Antony, 2001; Bjorkman *et al.*, 1997; Fujii *et al.*, 2001) que se presentan en forma esporádica o endémica; así como repetición de abortos y de mortalidad (Kim *et al.*, 2002a) en los bovinos (Petersen *et al.*, 1999).

Recientemente se han reportado infecciones por *N. caninum* en Escandinava (Petersen *et al.*, 1999), Australia, Nueva Zelanda (Reichel, 2000), Estados Unidos, Reino Unido (Atkinson *et al.*, 2000; Dubey, 2003b; Dubey *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1999b; Lally *et al.*, 1996), Corea del Sur (Bae *et al.*, 2000) Argentina, Bélgica, Canadá, Dinamarca, Alemania, Hungría, Italia, Japón, México, España, Suiza, Zimbabwe (Dubey, 1999b, 2003b), Europa, Tailandia (Dubey, 2003a), Brasil, Canadá, Costa Rica, Francia, Hungría, Irlanda, Israel, Países bajos, Polonia, Portugal y Sudáfrica (Dubey, 2003b). Además de que los abortos y muertes neonatales, han sido reportados en ganado de carne de Australia, Canadá, EUA, Bélgica (Dubey, 2003a) y Corea del Sur (Kim *et al.*, 2002a).

La neosporosis bovina es una enfermedad identificada recientemente en México y se ha reconocido como una de las principales causas de aborto en el ámbito mundial, aislándose el agente por primera vez en fetos en 1993 (Calzada *et al.*, 2002).

7. Ciclo biológico

El ciclo biológico de *N. caninum* es indirecto e involucra a dos hospederos: los perros se han identificado recientemente como los hospederos definitivos mientras que muchas especies pueden actuar como hospederos intermediarios (herbívoros – carnívoros) (Baszler *et al.*, 2001; Dijkstra *et al.*, 2001a; Guarino *et al.*, 2000). Sin embargo, avances recientes relativos al ciclo biológico de *Neospora* reportan que los perros pueden ser hospederos tanto intermediarios como definitivos (Collantes *et al.*, 2002).

Según Dubey *et al.*, (1997); Dubey, *et al.*, (1998a); Bjorkman, *et al.*, (1999); Petersen (1999), el ciclo biológico de *N. caninum* es desconocido, y que a diferencia de *T. gondii* el gato no es el hospedero definitivo de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 1998b). Sin embargo, gracias a las pruebas realizadas experimentalmente en perros actualmente se sabe que el hospedero definitivo es el perro (Bae *et al.*, 2000).

□ CICLO DE VIDA PROPUESTO PARA *NEOSPORA* □

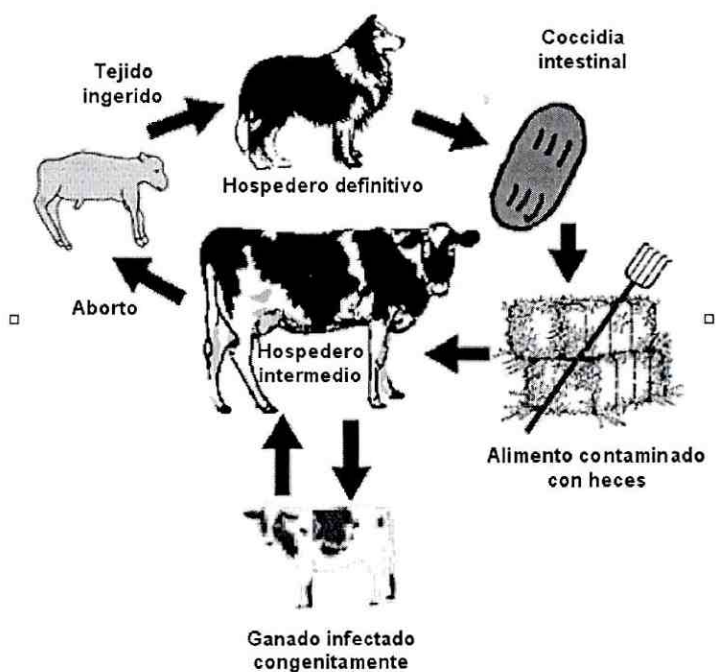


Figura 1. Ciclo de vida de *Neospora caninum*

En el ciclo de vida de *N. caninum* se identifican tres estadios infecciosos: taquizoítos, quistes tisulares y ooquistes (Dubey, 2003b).

La fase de reproducción sexual del ciclo biológico de *N. caninum* se completa únicamente en los intestinos de los perros que son los hospederos definitivos, de esta manera, los ooquistes son eliminados a través de las heces (Dijkstra *et al.*, 2001b; Petersen *et al.*, 1999; Reichel, 2000; Toolan, 2003) y son localizados después de 8 días de la infección y excretados durante los días 17 a 19 (Lindsay *et al.*, 1999), aunque se ha reportado que los perros excretan ooquistes después de un periodo de latencia de cinco días (Lindsay *et al.*, 1999).

Tanto los taquizoítos como los bradizoítos formadores de quistes tisulares son los estadios que se caracterizan por ser parte de la fase asexual y se encuentran de manera intracelular en un amplio rango de hospederos intermediarios, (Dubey, 2003b; Son *et al.*, 2001) que incluyen a los bovinos (Collantes *et al.*, 2002; Dijkstra *et al.*, 2001b), los perros (Toolan, 2003), las ovejas, los caballos, las cabras, las zorras, los coyotes, los ciervos, los búfalos, los camellos y otros animales silvestres que son hospederos intermediarios naturales y los gatos, ratones, ratas, gerbos y monos son hospederos intermediarios experimentales (Collantes *et al.*, 2002; Sánchez *et al.*, 2003)

Los ooquistes eliminados en las heces de los perros, son después consumidos por los hospederos intermediarios, en los que bajo condiciones óptimas esporulan dentro de las 24 horas o en tres días desarrollándose dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos (Lindsay *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2003) que son liberados e infestan el intestino delgado y se dividen rápidamente por endogenia y se transforman en taquizoítos, con lo cual pueden infectar el músculo esquelético y cardíaco, el tejido conectivo y el hígado, donde se multiplican. Poco después, los quistes contienen bradizoítos desarrollados, los

que presentan afinidad por el SNC, los nervios periféricos y la retina (Sánchez *et al.*, 2003).

La ingestión de ooquistes de perros con infección aguda es una forma de transmisión de *N. caninum* al ganado (McAllister *et al.*, 2000; Sánchez *et al.*, 2003), después de la ingestión, es probable que *N. caninum* se transmita a través de la placenta e infecte al feto, es decir, el parásito puede transmitirse de una madre a su progenie durante la preñez (Bjorkman *et al.*, 1999). La segunda forma de infección trasplacentaria es, de vaquillas infectadas congénitamente a su progenie, lo cual puede ser aparente en generaciones sucesivas de vacas infectadas. Este patrón de transmisión es llamado de propagación vertical (McAllister *et al.*, 2000).

8. Transmisión

Hay varias formas por las cuales el ganado y otros hospederos susceptibles adquieren la infección por Neospora, que puede ser en forma trasplacentaria o vertical; y en forma horizontal como la infección postnatal o congénita de los taquizoítos, es decir, de la madre a su feto (Anderson *et al.*, 2000; Dijkstra *et al.*, 2001a; Dubey, 2003b; French *et al.*, 1999) por la ingestión de alimentos y agua contaminada con heces fecales del hospedero definitivo que contengan ooquistes (Dubey, 1999b; Schares *et al.*, 2001; Toolan, 2003) y es la causa más probable de la lluvia de abortos por neosporosis en el ganado (Gondim *et al.*, 2002; McAllister *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 2001).

Hay dos tipos de transmisión horizontal que son: vía un hospedero definitivo; o por transmisión de *N. caninum* natural o experimentalmente de la vaca a su becerro a través del calostro o de la leche que contienen taquizoítos (Anderson *et al.*, 2000; Antony, 2001; Dubey, 1999b, 2003b; Reichel, 2000; Schares *et al.*, 2001), pero no se manifiesta de vaca a vaca o no se sabe que ocurra (Dubey, 2003b; Toolan, 2003).

En un hato, tanto la transmisión horizontal como la vertical juegan un papel importante en el mantenimiento de la infección por *N. caninum* (Antony, 2001; Kobayashi *et al.*, 2002) por generaciones con gran eficiencia (Andrianarivo *et al.*, 2000; Dubey, 1999b; Dubey *et al.*, 1999a; Kobayashi *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 1999; Toolan, 2003). La infección congénita o postnatal es una importante forma de transmisión de *N. caninum* al ganado (Atkinson *et al.*, 2000; Bjorkman *et al.*, 2000; Dubey, 1999b; Dubey *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1997; Toolan, 2003).

El mecanismo de transmisión congénita primaria y repetida de la neosporosis es desconocido, mientras que la infección congénita repetida que puede ocurrir en perros y en el ganado se debe a una recidiva de la enfermedad, o a una reinfección que aún no está clara (Dubey, 1999b).

La transmisión trasplacentaria del parásito es decir, de una vaca infectada a sus fetos durante la preñez, frecuentemente provoca el nacimiento de un becerro infectado congénitamente aparentemente sano (Andrianarivo *et al.*, 2000; Antony, 2001; Reichel, 2000; Schares *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios previos muestran que no todas las vacas seropositivas transmiten la infección a su progenie, indicando que algunas vacas desarrollan una respuesta inmunitaria (Andrianarivo *et al.*, 2000).

La transmisión vertical o propagación parecen ser importantes en la dispersión de *N. caninum* en el ganado, pero puede infectar a otras especies incluyendo ratones, gatos, monos, cerdos, caballos, ovejas, cabras, animales salvajes y en cautiverio (Dubey, 1999b; Schares *et al.*, 2001; Toolan, 2003) y perros, en los que las hembras también transmiten la infección a su cachorro (Reichel, 2000).

Después de haber consumido ratones infectados, los perros eliminan grandes cantidades de ooquistes de *N. caninum* (Gondim *et al.*, 2002); en contraste, los

perros alimentados con leche infestada de taquizoítos, estos no se convierten en ooquistes (Dubey, 2003b).

Los perros pueden adquirir la infección por ingestión de tejidos de hospederos intermediarios infectados (Dubey, 2003b), tales como fetos abortados, descargas uterinas y secundinas (placenta) ya que el parásito infecta naturalmente a la placenta (Dijkstra *et al.*, 2001b; Dubey, 2003b; Toolan, 2003), mientras que el consumo de fetos abortados por los bovinos al parecer no es una fuente importante de infección por *Neospora* (Dubey, 2003b).

La transmisión de *N. caninum* en forma natural es oral cíclica; el bajo número de ooquistes que causa infecciones en becerros (cerca de 300) incrementa la posibilidad de la transmisión canina de este parásito (Andrianarivo *et al.*, 2000; Gondim *et al.*, 2002). Por otra parte, *N. caninum* no se transmite en forma venérea por lo que en los bovinos, la transferencia de embriones se recomendada como el método de control para prevenir la transmisión vertical (Dubey, 2003b).

9. Modelo animal

Los perros, los bovinos, los gatos, las zorras, las ovejas, los cerdos, las cabras, los coyotes, las aves, los monos, los ratones, las ratas de arena y algunas especies de gerbos (*Meriones unguiculatus*, *Meriones tristami*, y *Psammomys obesus*) son susceptibles y se pueden infectar experimentalmente con taquizoítos de *N. caninum* (Dubey, 2003b; Nishikawa *et al.*, 2002b; Uchida *et al.*, 2003), además de que los hámsters *Djungarian* también pueden ser usados como modelo para vigilar la neosporosis (Uchida *et al.*, 2003).

Bajo condiciones de laboratorio los perros alimentados con quistes tisulares de cerebros de ratones infectados experimentalmente mostraron ooquistes, (Dubey *et al.*, 1999a), los cuales al extraerse de las heces, causaron infecciones fatales en el interferón gamma de eliminación (γ -IFN-KO) de los ratones y la microscopía de

transmisión de electrones y la inmunohistoquímica demostraron que la infección con *N. caninum* se había establecido (Lindsay *et al.*, 1999).

10. Diferenciación entre Neosporosis y Toxoplasmosis

Debido a las formas de taquizoítos y el amplio rango de sus hospederos ubicuos (Bae *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 1998; Schares *et al.*, 1999), además de sus similitudes morfológicas y biológicas, hasta 1988, *N. caninum* se había diagnosticado incorrectamente como *T. gondii* (Atkinson *et al.*, 2000; Calzada *et al.*, 2002; Dubey, 1999a; Jenkins *et al.*, 1997; Nam *et al.*, 1998; Tranas *et al.*, 1999) pero pueden ser distinguidos por su ultraestructura y sus propiedades antigénicas y genéticas (Atkinson *et al.*, 2000; Dubey, 2003b; Nam *et al.*, 1998). Además, *N. caninum* es la principal causa de aborto en los bovinos, mientras que *T. gondii* no se considera un abortivo para estos (Dubey, 1999a, 2003a). Mientras que *N. caninum* no se considera patógeno en humanos, *T. gondii* puede causar pérdidas de la visión o aún peor la muerte en el hombre (Dubey, 1999a), así mismo, es la principal causa de enfermedad en las ovejas y no de los bovinos, mientras que al contrario la neosporosis es una enfermedad principalmente de ganado y no de ovejas (Dubey, 2003b).

N. caninum y *T. gondii* son antigénicamente diferentes en la mayoría de sus proteínas superficiales. Por ejemplo; las principales proteínas de superficie son la 43 KDa (Nc-p43), 36 y 29 Kda, y ausentes en *T. gondii*, y la SAG1 (p30) y SAG2 (p22) de *T. gondii*, a su vez están ausentes en *N. caninum* (Bae *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 1998). Por otra parte, los ooquistes de *N. caninum* se eliminan por los perros, contrario a los de *T. gondii* que son eliminados por los gatos (Tranas *et al.*, 1999).

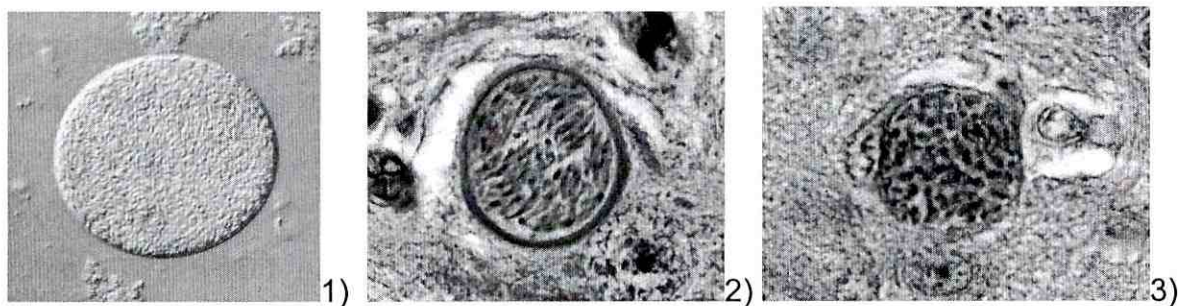
Los ooquistes de todas las especies de coccidias del grupo *Toxoplamatidae* son morfológicamente indistinguibles uno de otro, ya que tienen una pared delgada y

casi esférica, de sólo 11 a 14 μm de diámetro (Dubey, 2003b; Nishikawa *et al.*, 2002a; Slapeta *et al.*, 2002).

N. caninum y *T. gondii* tienen varias semejanzas; por ejemplo, en las lesiones por *N. caninum* en los fetos son muy semejantes a las que existen en la toxoplasmosis congénita (Petersen *et al.*, 1999).

Otra semejanza es la pared de los quistes de *N. caninum* con las de *T. gondii* y *H. hammondi* (Nishikawa *et al.*, 2002a). Además, los taquizoítos de *Neospora* pueden ser mantenidos *in vitro* por métodos de cultivo similares a los de *T. gondii* (Schaes *et al.*, 1999). A pesar de lo anterior, por microscopía de luz, los quistes tisulares de *N. caninum* pueden ser distinguidos de los de *T. gondii*, debido a que los quistes tisulares de *N. caninum* tienen una pared más gruesa ($> 1 \mu\text{m}$) comparados con los de *T. gondii* ($< 0.5 \mu\text{m}$) (Dubey *et al.*, 1998a) no así para los taquizoítos (Guarino *et al.*, 2000) y además de que el aislamiento de *N. caninum* en cultivo de células de ratón es más difícil que para *T. gondii* (Dubey *et al.*, 1998a) y que *Neospora* puede ser cultivada *in vitro* directamente de ooquistes (Gondim *et al.*, 2002).

A continuación en las figuras siguientes se aprecian las fotos de una etapa de *N. caninum* y *T. gondii* (quiste tisular):



- 1) Quiste tisular *T. gondii* (ratón)
- 2) Quiste tisular de *N. caninum* (becerro)
- 3) Quiste tisular de *T. gondii* (ratón)

Figura 2. Quistes tisulares de *T. gondii* y *N. caninum*

N. caninum y *T. gondii* tienen distintas características antigénicas que pueden ser observadas por métodos serológicos y de inmunohistoquímica (Petersen *et al.*, 1999). Las técnicas de diagnóstico molecular, como la PCR, por medio de coprodiagnóstico ofrecen una alta sensibilidad y especificidad de técnicas alternativas para distinguir entre estas dos coccidias morfológicamente idénticas (Slapeta *et al.*, 2002)

Los antígenos dominantes de *N. caninum* son diferentes de los observados en *T. gondii* por la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes y Western Immunoblot (Schaes *et al.*, 1999). Además de que parece haber un reacción cruzada serológica entre *N. caninum* y *T. gondii* debida a la presencia de determinantes antigénicos comunes (Bae *et al.*, 2000; Nam *et al.*, 1998). Por otra parte, también el método de transmisión los hace diferentes, ya que es improbable que esté estrechamente relacionados porque *N. caninum* se puede transmitir de la madre a su progeie en gestaciones consecutivas y *T. gondii* no (Stenlund *et al.*, 1999).

Los humanos infectados con *T. gondii* son usualmente asintomáticos o manifiestan una gripe, pero el patógeno es clínicamente importante en individuos inmunocomprometidos como el feto de la madre infectada (Tranas *et al.*, 1999). También se sabe que las mujeres que se infectan durante la preñez pueden abortar o dar a luz a niños con encefalitis o hidrocefalia; no obstante, muchas de las infecciones prenatales son subclínicas al nacimiento pero pueden conducir a una disminución de la visión o la audición, a retraso mental o a convulsiones (Tranas *et al.*, 1999).

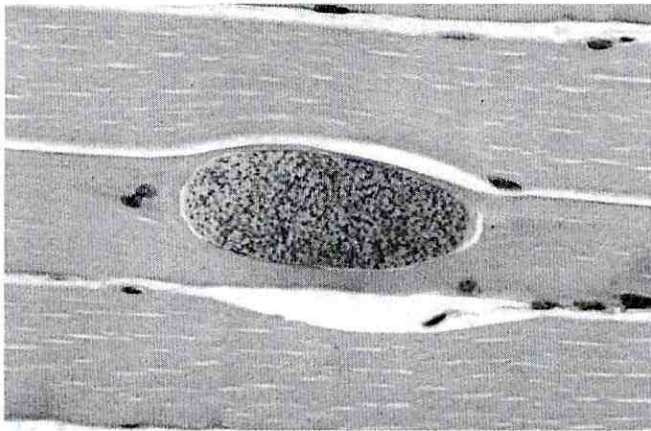
11. Diferenciación con *Hammondia spp*

N. caninum está estrechamente relacionado con *H. heydorni* (Gondim *et al.*, 2002) y los ooquistes de estas dos especies son morfológicamente indistinguibles (Slapeta *et al.*, 2002) de los ooquistes de *H. heydorni* obtenidos de las heces de

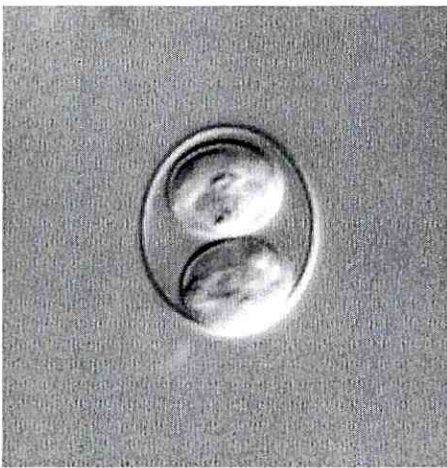
los perros y de *H. hammondi* obtenidos de las heces de los gatos (Nishikawa et al., 2002a).

Se considera a *H. heydorni* como un parásito del grupo de las coccidias, no patógeno para los perros y que está estrechamente relacionado con *N. caninum* (Slapeta et al., 2002) y probablemente con *T. gondii* (Ellis et al., 1999).

Dentro de las principales semejanzas entre *N. caninum* y *H. hammondi* se encuentran la pared del quiste y el que no existe reacción cruzada entre *H. hammondy* con la superficie recombinante del antígeno de *N. caninum* (NcSRS2) por ELISA (Nishikawa et al., 2002a).



1)



2)



3)

- 1) Quiste tisular (ratón) de *Hammondia hammondy*
- 2) Ooquiste (perro) *Hammondia heydorni*

3) Ooquiste de *T. gondii* (ratón)

Figura 3. Quistes y ooquistes de *T. gondii* y del género *Hammondia*

12. Diferenciación con *Sarcocystis spp*

La Inmunohistoquímica y la detección del DNA de *T. gondii* y *S. cruzi* por PCR pueden distinguirlos de *N. caninum*. Las formas de esquizontes de *S. cruzi* en el endotelio vascular se encuentran raramente en los cerebros de fetos abortados mientras que *N. caninum* usualmente se localiza en tejidos extravasculares. Adicionalmente no existen esquizontes inmaduros en la infección con *N. caninum*, en contraste con la infección con *S. cruzi*. La infección de *T. gondii* en fetos de bovinos es rara (Dubey, 2003b).

13. Hospederos intermediarios

13.1. Neosporosis en ganado

La neosporosis es la principal causa de aborto tanto en el ganado lechero (Dubey, 1999b; Jenkins *et al.*, 1997; Lindsay *et al.*, 1999) como el ganado de carne (Dubey, 1999b, 2003a; Jenkins *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 2001) y es la principal causa de mortalidad neonatal bovina en todo el mundo (Scharles *et al.*, 1999; Schares *et al.*, 2001), no obstante, la neosporosis no representa un problema grave en bovinos productores de carne comparado con la industria lechera (Kim *et al.*, 2002a) y los fetos abortados se pueden presentar tanto en vaquillas como en vacas adultas (Anderson *et al.*, 2000).

Las características de la enfermedad en bovinos productores de leche son: (1) la alta probabilidad de transmisión vertical, (2) el impacto en la mortalidad y reproducción, y (3) el efecto compensatorio en la supervivencia y reproducción del ganado no infectado (French *et al.*, 1999).

13.1.1. Signos clínicos

En todo el mundo es frecuente que *N. caninum* infecte a hospederos intermediarios como los bovinos en los cuales, el aborto es el signo clínico más común (Sánchez *et al.*, 2003; Stoessel *et al.*, 2003) como resultado de la transferencia congénita de los taquizoítos al feto durante la gestación; no obstante, la infección fetal no siempre provoca aborto (Jenkins *et al.*, 2002).

Las pérdidas fetales o las retenciones de placenta sin enfermedad en la madre también son signos clínicos importantes para el diagnóstico de la neosporosis en bovinos (Toolan, 2003).

El aborto también puede ser el resultado que se recrudezca la infección crónica activada por una inmodulación o evento supresor, así como en la infección recurrente con virus de la diarrea viral bovina (Reichel, 2000).

Las vacas abortan en cualquier fase de la gestación y tanto el aborto o la infección congénita pueden presentarse en sus gestaciones posteriores (Dubey *et al.*, 1997) por muchos años o tener una preñes normal que ocurra entre dos preñeces y al final presentarse el aborto o el nacimiento de un becerro infectado congénitamente (Andrianarivo *et al.*, 2000; Toolan, 2003).

Las vacas que consumen raciones infestadas por *N. caninum* adquieren la infección (Dubey, 1999b, 2003a; Toolan, 2003) por la cual el feto puede morir en el útero, ser reabsorbido, ser momificado, nacer vivo y morir y nacer vivo con signos clínicos o aparentemente sano pero crónicamente infectado (Dubey, 1999b, 2003a; Toolan, 2003). En las vacas el aborto se presenta a los 5 o 6 meses, pero puede ocurrir desde el tercer tercio de la gestación o hasta el fin de la misma (Andrianarivo *et al.*, 2000; Dubey, 1999b, 2003b; Stenlund *et al.*, 1999).

Los signos clínicos de neosporosis sólo se han reportado en becerros infectados congénitamente de hasta dos meses de edad (Dubey, 1999b, 2003a; Reichel, 2000; Toolan, 2003) e incluyen signos neurológicos, incapacidad para levantarse, bajo peso al nacimiento o bien, pueden nacer con signos de la enfermedad (Dubey, 2003b; Reichel, 2000).

En cachorros, bovinos, ovejas, cabras y caballos se ha descrito encefalomiелitis congénita (Packham *et al.*, 1998). En becerros infectados congénitamente se presenta paresia, encefalomiелitis y mortalidad neonatal (Collantes *et al.*, 2002; Howe *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002b; Kobayashi *et al.*, 2002; Tranas *et al.*, 1999).

La neosporosis en algunos hatos, afecta arriba del 90% del ganado, donde los becerros nacen infectados congénitamente, aparentemente saludables (Dubey, 2003a) y/o presentar signos neurológicos como parálisis espástica progresiva y ascendente; (Anderson *et al.*, 2000; Bjorkman *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 1999; Toolan, 2003), los miembros posteriores y/o anteriores pueden estar flexionados o hiperextendidos, y al examen neurológico puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar y pérdida de propiocepción de la conciencia, además de exoftalmia o apariencia asimétrica de los ojos (Dubey, 1999b, 2003a; Reichel, 2000; Toolan, 2003). Ocasionalmente se observan defectos al nacimiento como hidrocefalia y estrechamiento de la médula espinal (Dubey, 2003a); no obstante, los becerros con infección crónica pueden ser criados (Anderson *et al.*, 2000; Bjorkman *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 1999; Toolan, 2003).

Tanto en el ganado de carne como en el de leche, las vacas con anticuerpos seropositivos de *N. caninum* se relacionan más con los abortos que las vacas seronegativas. Sin embargo, más del 95% de los becerros vivos se infectan congénitamente de vacas seropositivas que permanecen clínicamente normales (Dubey, 2003b).

Factores como la edad de la madre, el número de lactancia y los antecedentes de aborto, generalmente no tienen que ver con el porcentaje de infección, pero se sabe que la infección persiste por transmisión vertical en el ganado y que afecta con más facilidad a las vacas jóvenes que a las vacas adultas (Dubey, 1999b, 2003b).

En todo el mundo los abortos por *N. caninum* en los hatos pueden ser esporádicos, endémicos o epidémicos (Bjorkman *et al.*, 2000; Dubey, 1999b, 2003b; McAllister *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 2000) y se pueden presentar tres patrones diferentes de aborto: 1) el aborto esporádico, definido como un solo aborto o un pequeño número de abortos que tienen intervalos irregulares y pasan del 3% en un año; 2) el aborto epidémico, término usado cuando hay más del 3% de abortos en el hato en 3 meses y/o el 10% de las vacas tienen riesgo de aborto dentro de las 6 a 8 semanas de gestación y; 3) el aborto endémico en el que se presentan más del 3% de abortos en un hato, en un año (Dubey, 2003b; Toolan, 2003).

En las áreas afectadas se reporta, que más del 33% de las vacas lecheras abortan por *N. caninum* en pocos meses de gestación (Dubey, 2003b) y se presentan durante todo el año pero en los Países bajos ocurren principalmente durante los meses de verano (Dubey, 2003a).

13.1.2. Prevalencia

Cuando una vaquilla infectada congénitamente se preña, es capaz de transmitir la infección a la siguiente generación (Anderson *et al.*, 2000), debido a que una característica importante de esta enfermedad es que el protozoario se mantiene en los bovinos como una infección crónica que puede ser transmitida a los fetos durante la gestación, manteniéndose la infección en el hato (Anderson *et al.*, 2000).

Actualmente se desconoce la prevalencia y supervivencia de los ooquistes de *N. caninum* en el medio ambiente, al igual que la incidencia de la repetición de abortos (Dubey, 1999a).

La prevalencia serológica de la infección en el ganado varía dependiendo de la población, región, tipo de prueba serológica usada, el nivel límite usado para determinar la exposición y la historia del aborto (Dubey, 2003a), la cual en algunos hatos puede ser alta, con un subsecuente infección congénita elevada (Reichel, 2000).

La seroprevalencia de neosporosis bovina en la región lechera de Tizayuca, Hidalgo es del 80% o más de vacas seropositivas que pueden transmitir la infección a su progenie o también de manera horizontal (Sánchez *et al.*, 2003). En un estudio realizado en México por Calzada, Morales *et al.* (2002), se reportó en los últimos tres años, una seroprevalencia del 72% en vacas pertenecientes a hatos con tasas anuales de aborto entre 13% y 30% (aborto epizootico), y del 36% en vacas pertenecientes a hatos con tasas de aborto hasta de 12% anual (aborto enzoótico), (Calzada *et al.*, 2002).

En la Isla Británica se estima que la prevalencia varía de 4.2% a un 17.4%, de becerros abortados, la primera estimación con base en Inmunohistoquímica y la segunda con base a pruebas serológicas (Toolan, 2003).

Barber *et al.* 1997 reportaron anticuerpos de *N. caninum* en el 11% en 300 perros de Bélgica; y el 22% en 200 perros de Nueva Zelanda (Dubey, 1999b; Reichel, 2000), y que la prevalencia de la infección por *Neospora* en el ganado lechero en este último país es estable, y sugiriendo que la neosporosis no es una enfermedad de reciente introducción (Reichel, 2000).

En Japón, un estudio reciente serológico reportó una alta prevalencia del 31% de perros con infección por *N. caninum*, de hatos lecheros con abortos comparado

con el 7% perros de áreas urbanas. En Australia, la seroprevalencia reportada de un estudio es de 95% de 451 perros; en Uruguay 20% de 414 perros, en América del sur; en las Islas Malvinas 0.2% de 500 perros; y en Kenia 0% de 140 perros (Dubey, 1999b).

En Suiza, la aparente baja prevalencia de *N. caninum* en ganado lechero aunada al hecho de que una alta proporción de infestaciones parece que se transmite verticalmente, es favorable en relación con los posibles programas futuros de control contra este parásito en los hatos lecheros (Bjorkman *et al.*, 2000).

Otros datos indican que en Italia se encontraron anticuerpos por la Prueba de Anticuerpos Fluorescentes Indirecta en 29% de 194 perros de Italia (Dubey, 1999b), mientras que Corea del Sur tiene un alto nivel de prevalencia (23%) comparado con otras naciones (Bae *et al.*, 2000), y se reporta que en California, los abortos se presentan más frecuentemente en los meses de invierno y que en el verano bajan rápidamente (Dubey, 2003a).

13.1.3. Diagnóstico

Se ha diagnosticado a la neosporosis como una de las causas más comunes de aborto en ganado en cualquier parte del mundo (Jenkins *et al.*, 2002; McAllister *et al.*, 2000).

Es necesario, examinar a los fetos para hacer un diagnóstico definitivo de neosporosis. Lo ideal sería que el feto entero pudiera ser sometido a examen, con lesiones no muy grandes y cuando no hay retención de placenta (Anderson *et al.*, 2000), pero en caso de que esto no fuera posible, las muestras de cerebro, corazón, hígado y placenta deben ser examinados por Histopatología (HP) o Inmunohistoquímica (IHC); bien, los fluidos corporales y el suero sanguíneo se deben evaluar por serología (Ahn *et al.*, 2003; Collantes *et al.*, 2002; Dubey, 1999b, 2003b), así como, identificar el ADN del parásito mediante PCR (Baszler *et*

al., 2001; Dubey, 2003b; Jenkins *et al.*, 2002; Schares *et al.*, 2000), y pruebas inmunohistoquímicas (Anderson *et al.*, 2000; Barr *et al.*, 1991) y ELISA (Baszler *et al.*, 2001).

El diagnóstico definitivo de abortos por neosporosis se lleva a cabo por la demostración del parásito en los tejidos de fetos abortados (Anderson *et al.*, 2000; Barr *et al.*, 1991; Dubey, 1999b; Lally *et al.*, 1996; Wouda *et al.*, 1998). Sin embargo, esto no es posible cuando los parásitos están presentes en fetos abortados con una autólisis severa de las células hospederas (Anderson *et al.*, 2000; Barr *et al.*, 1991; Dubey, 1999b; Lally *et al.*, 1996) lo que también dificulta los aislamientos en cultivo celular (Dubey, 1999b).

Debido a que la mayoría de los fetos abortados se autolizan, aún el tejido cerebral semilíquido debe fijarse en formalina amortiguada neutra al 10% para el examen histológico de secciones teñidas con hematoxilina y eosina e incluido en parafina (Dubey, 2003b). sin embargo, el examen microscópico no es suficiente para identificar a los ooquistes de *N. caninum* en heces de perro (Dubey, 2003b).

Las pruebas de tejidos y fluidos de individuos inmunocomprometidos y fetos sospechosos de toxoplasmosis pueden revelar que una gran población de estos pacientes están infectados con *N. caninum* (Tranas *et al.*, 1999). Además, se puede usar una nueva prueba a través de Nc-p43 para el diagnóstico de neosporosis en el ganado (Ahn *et al.*, 2003).

Diagnóstico Histológico

El principal método de diagnóstico de la infección de *N. caninum* en fetos abortados es por Histopatología (HP), seguido por una identificación específica por inmunohistoquímica (IHC) del parásito dentro de los tejidos con necrosis multifocal, epicarditis y placentitis (Baszler *et al.*, 1999; Baszler *et al.*, 1996) usando tinciones de anticuerpos específicos (Anderson *et al.*, 2000; Bjorkman *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1997).

La identificación de *N. caninum* puede llevarse a cabo mediante técnicas de inmunohistoquímica (Maley *et al.*, 2001) en cerebro de fetos abortados (Dubey, 2003b; Dubey *et al.*, 1997; Kashiwazaki *et al.*, 2004) usando además muestras de pulmón, riñón, y músculo esquelético (Anderson *et al.*, 2000).

N. caninum se puede aislar fácilmente de tejidos nerviosos de becerros infectados congénitamente debido a que los quistes tisulares probablemente están presentes y son más resistentes a la autólisis que los taquizoítos (Dubey, 2003b), además, debido a un bajo número de parásitos y en ocasiones debido a la baja calidad de los tejidos fetales que están autolizados, momificados o macerados, la IHC es relativamente insensible para la detección del parásito en tejidos del hospedero (Baszler *et al.*, 1999; Collantes *et al.*, 2002; Dubey, 1999b) y posiblemente de resultados falsos negativos (Collantes *et al.*, 2002).

Diagnóstico Serológico

Existen varias técnicas disponibles para diagnosticar el aborto en bovinos. Cada una de estas pruebas de diagnóstico tiene sus ventajas y sus limitaciones (Jenkins *et al.*, 2002). Existen pruebas serológicas que se utilizan para el diagnóstico de la infección de *N. caninum* en el ganado, incluyendo la Prueba de Fluorescencia Indirecta (IFA), el de Western Blot, el de aglutinación y varios de Inmunoabsorbencia de Enzimas Ligadas (ELISA), basados tanto en antígenos nativos de *N. caninum* completos o purificados o en antígenos recombinantes, en la avidéz a los anticuerpos o en la inhibición competitiva con anticuerpos monoclonales específicos al parásito (Atkinson *et al.*, 2000; Baszler *et al.*, 2001; Dubey, 2003b; Maley *et al.*, 2001; Wouda *et al.*, 1998) y la prueba de anticuerpos de Neospora (NAT) (Baszler *et al.*, 2001; Dubey, 2003a). Además se ha reportado el uso de tres proteínas recombinantes de *N. caninum* para el diagnóstico de la neosporosis bovina (Dubey, 1999b). Los reactivos para algunas de estas pruebas están disponibles comercialmente (Dubey, 1999b)

En la neosporosis bovina, las pruebas serológicas son útiles para la identificación del parásito como la causa probable del aborto y así hacer un análisis de la propagación vertical del parásito (Baszler *et al.*, 2001; Schares *et al.*, 2000), estas pruebas sirven para investigaciones epidemiológicas basadas en la población, la transmisión de la enfermedad, los factores de riesgo y la identificación de hospederos definitivos e intermediarios adicionales (Baszler *et al.*, 2001).

En el animal vivo, la presencia de anticuerpos contra el parásito puede ser usada como indicativa de la infección por *N. caninum* (Bjorkman *et al.*, 2000; Bjorkman *et al.*, 1997; Dubey, 2003b; McAllister *et al.*, 2000; Reichel, 2000; Stenlund *et al.*, 1999) y puede ser demostrada por los diferentes métodos de diagnóstico anteriormente mencionados (Bjorkman *et al.*, 2000); Sin embargo, hasta ahora, no es posible determinar el tiempo de la infección inicial con base en las pruebas serológicas (McAllister *et al.*, 2000).

La caracterización de los antígenos de *N. caninum* es un prerrequisito importante para detallar los análisis de la respuesta inmune en animales infectados y para el desarrollo de herramientas diagnósticas seguras (Scharles *et al.*, 1999).

El diagnóstico serológico ha avanzado considerablemente (Ahn *et al.*, 2003) y para la detección de anticuerpos de *N. caninum* en fetos de bovinos, están disponibles una variedad de pruebas. Estos ensayos utilizan taquizoítos de *N. caninum* secos o fijados en el IFAT, o bien a través de Pruebas de aglutinación (Jenkins *et al.*, 2002; Lally *et al.*, 1996; Stenlund *et al.*, 1999)

En Corea, se ha aislado *N. caninum* de fetos abortados del ganado por lo que es necesario debido a esto establecer métodos de diagnóstico serológicos eficientes como ELISA para una mayor cobertura en la prevalencia de la infección en el ganado (Bae *et al.*, 2000).

La prueba IFA fue la primera en ser utilizada para la identificación de anticuerpos de *Neospora* en el suero de ganado (Bjorkman *et al.*, 1997). Los anticuerpos específicos se detectan en la sangre materna, con cultivo celular derivado de células de taquizoítos, los cuales son adecuados para la identificación de hatos infectados por neospora (Baszler *et al.*, 1996). Otra prueba es N-MAT, que es una técnica rápida, altamente sensible y fácil de usar y que puede ser ideal para proteger gran número de animales domésticos y silvestres y obtener muestras identificar la presencia de anticuerpos de *N. caninum*. Estas pruebas pueden ser usadas en suero hemolizado sabiendo la existencia de los resultados falsos positivos por hemolización severa del suero (Packham *et al.*, 1998).

Se han descrito numerosas pruebas de ELISA en que se usan taquizoítos de *N. caninum* fijados, extractos de taquizoítos en detergente acuoso o soluble, antígenos de taquizoítos incorporados dentro de los complejos inmunoestimulantes (iscoms) o antígenos recombinantes de taquizoítos (Jenkins *et al.*, 2002), aunque el diseño de una prueba de ELISA más rápida, para distinguir en el ganado una infección reciente de una crónica es un enfoque prometedor para distinguir abortos endémicos o epidémicos (Dubey, 2003b).

Otra Prueba de ELISA desarrollada para la demostración de anticuerpos para *N. caninum* en suero de perros, los antígenos son incorporados al complejo de inmunoestimulación o inmunoestimulantes (iscoms) y una de anticuerpos monoclonales para IgG de perros, los iscoms, son estructuras parecidas a jaulas de cerca de 40 nm, compuestas de saponinas quillajas, colesterol, fosfolípidos y antígenos (Bjorkman *et al.*, 1997).

Comercialmente existe también la modificación de un anticuerpo monoclonal (Mab) basada en ELISA, que define claramente un suero negativo de un positivo de *N. caninum*. La especificidad de ELISA depende de un Mab conjugado 4A4-2 específico para el parásito (Baszler *et al.*, 2001).

Hay otra prueba de ELISA que usa antígenos recombinantes con taquizoítos de *N. caninum* para identificar a vacas infestadas con el parásito y para corroborar el diagnóstico por neosporosis (Jenkins *et al.*, 1997). Actualmente, por su alta especificidad y sensibilidad como método serodiagnóstico de la infección por neospora se ha propuesto una prueba ELISA con Nc-p43 recombinante (Tomioka *et al.*, 2003)

Las proteínas anfipáticas, por ejemplo, las proteínas de membrana, son rápidamente incorporadas dentro de los iscoms; de esta manera los iscoms son utilizados como herramientas para seleccionar las proteínas de la membrana de los parásitos y así disminuyen el número de proteínas intracelulares que pueden causar problemas como aglutinación y reacción cruzada en una prueba de ELISA (Bjorkman *et al.*, 1997).

Los iscoms se usan principalmente en ELISA como antígenos para la detección de anticuerpos para *T. gondii* en suero de ovejas y ganado bovino y en suero de perros afectados por *N. caninum*, aumentando la especificidad de la prueba cuando el antígeno usado consiste en las proteínas del parásito incorporadas dentro de los iscoms en vez de extractos de taquizoítos ordinarios (Bjorkman *et al.*, 1997).

Según Björman *et al.*, (1997) las vacas que abortan fetos infectados con *Neospora* son todas positivas al iscom de ELISA. De acuerdo a esto, la sensibilidad de este método es satisfactoria; el problema se presenta en animales con infección crónica y que muestren pocos signos clínicos (Bjorkman *et al.*, 1997). Por otro lado, el análisis de Western blot revelan que los iscoms de *Neospora* contienen varios antígenos y que los antígenos con masas moleculares de 31-36 KDa y 45-52 KDa aparentan estar más concentrados en los iscoms (Dubey, 2003b).

El examen del suero de una vaca que aborta es indicativo de la exposición a *N. caninum* y se debe hacer un examen histológico de los fetos a través de

necropsias para hacer un diagnóstico definitivo de neosporosis (Dubey, 2003a), aunque también se puede usar suero sanguíneo u otro fluido corporal del feto para hacer un diagnóstico serológico por la técnica de ELISA, que determina rápidamente la posibilidad de encontrar niveles de anticuerpos en fluidos corporales como suero, leche (Bjorkman *et al.*, 1997) y fluidos fetales (Dubey, 2003a) siendo preferible usar el fluido peritoneal que otros fluidos corporales (Dubey, 2003b).

Cuando se realiza la prueba de ELISA se evalúan los anticuerpos mostrados a *N. caninum* en leche y se han usado de muestras de vacas seropositivas y seronegativas, encontrándose que la relación entre suero de leche por ELISA se ha encontrado que es hasta un 95 % efectiva. Esto es muy prometedor, ya que las muestras de leche son más fáciles de recolectar que las muestras sanguíneas y pueden tomarse por el dueño del animal o el que lo atiende (Bjorkman *et al.*, 1997).

Los hallazgos de anticuerpos de *N. caninum* en suero fetal o en suero de becerro sin calostrear son indicativos de la infección (Dubey, 1999b, 2003a), pero un resultado negativo en un feto es menos útil cuando su síntesis de anticuerpos depende del estado de gestación, del nivel de exposición y del tiempo entre la infección y el aborto (Dubey, 1999b).

Aunque, la presencia de anticuerpos específicos para *N. caninum* en el feto, fluidos fetales, en el becerro o en el suero de la madre no siempre ayuda lo suficiente en el diagnóstico de la infección; no obstante, puede dar evidencia del posible papel que juegan en el ciclo biológico o en la epidemiología de *N. caninum*. En general, los becerros infectados en el útero con *N. caninum* contienen anticuerpos específicos contra el parásito (Jenkins *et al.*, 2002).

En los casos en el que los fetos abortados no están disponibles para un diagnóstico de laboratorio veterinario, el diagnóstico se basa solamente en una

prueba serológica de la madre para detectar la presencia de anticuerpos contra el parásito (Jenkins *et al.*, 2002).

En el animal vivo, la presencia de anticuerpos IgG a *N. caninum* en suero, indican que el individuo ha sido infectado por el parásito (Bjorkman *et al.*, 1999). Por esta razón, en becerros antes de que se amamanten, sus sueros deben ser sometidos a pruebas serológicas para determinar si la infección es congénita (Dubey, 2003b). Por otra parte, los IgG pueden persistir en niveles altos por largo tiempo y pueden fluctuar durante la preñez. Por lo tanto, el nivel de IgG o los títulos altos de anticuerpos no pueden ser usados para estimar si un individuo sufre de una neosporosis aguda o crónica (Bjorkman *et al.*, 1999), pero la determinación de los valores de la avidéz de los IgG indican que las vacas han adquirido la infección durante la preñez (Dubey, 2003a), por lo que, la medición de avidéz (afinidad funcional) de anticuerpos específicos IgG es usada para diagnosticar infecciones primarias de *T. gondii* en humanos y para distinguir infecciones primarias de secundarias (Bjorkman *et al.*, 1999).

Recientemente se logró identificar a través de PCR a *N. caninum*, principalmente en el cerebro y médula espinal de vacas positivas a anticuerpos anti-*N. caninum* y con infección crónica latente (Calzada *et al.*, 2002). También, se ha usado la técnica de PCR como herramienta de diagnóstico para la identificación del parásito en fetos abortados de bovinos y para estudiar su distribución en ratones infectados experimentalmente, así como el primer paso para caracterizar un modelo experimental de la infección que puede ser usada en un futuro próximo en fármacos y vacunas (Collantes *et al.*, 2002).

La detección del ADN de *N. caninum* con la prueba de PCR es sensible y específica por lo que puede ser usada como auxiliar en el diagnóstico del aborto cuando los cambios patológicos son consistentes pero no pueden ser confirmados por IHC o serología (Baszler *et al.*, 1999). Además, la eficacia de diagnóstico por PCR depende del laboratorio, del personal que ahí labora o del

grado de autólisis del feto, de la técnica de muestreo y del procesamiento de muestras (Dubey, 2003a).

Dada la baja sensibilidad de las tinciones por Inmunohistoquímica varios investigadores han aplicado PCR para amplificar las secuencias de ADN de *N. caninum* de tejidos frescos, congelado, fijado en formalina, o tejidos fetales embebidos de parafina; las pruebas usadas para este propósito son PCR estándar, semicuantitativa, PCR alojado sólo en tubo, o PCR seguido de una examen de hibridación. Los avances ofrecidos por esta técnica son altamente sensibles y específicos (Jenkins *et al.*, 2002), por esto, la detección del parásito por inmunohistoquímica y por ADN mediante PCR, pueden hacer la distinción de neospora (Dubey, 2003a).

La edad del animal puede afectar la selección de un valor límite. Por ejemplo, en IFAT títulos de 1:640 o 1:200 se consideran como indicativos de la infección por *N. caninum* en ganado adulto, mientras que muchos valores por debajo de 1:80 han sido seleccionados como valores límite para muestras de fetos de bovino, pero un título límite definitivo para serodiagnóstico no está bien establecido por lo incierto del diagnóstico serológico en animales con infección crónica y por la limitada disponibilidad de suero de ganado no infectado (Dubey, 1999b). Por otra parte, un nivel bajo de títulos en IFAT de 1:25 se considera como específica de la infección por *N. caninum* en fetos (Dubey, 2003b; Dubey *et al.*, 2002) mientras que Jenkins *et al.* 2000 consideran que el título NAT es indicador de una exposición más conservadora de 1:80 (Dubey *et al.*, 2002).

Muchas de las vacas que no abortan tienen altos niveles de anticuerpos para *N. caninum*, indicando que la detección de anticuerpos por algunas pruebas serológicas como IFAT y ELISA, es una evidencia insuficiente para un diagnóstico etiológico del aborto por *N. caninum* en vacas. Sin embargo, la ausencia de anticuerpos en una vaca que aborta puede ayudar a descartar la causa etiológica del aborto (Dubey *et al.*, 1997).

Los títulos de anticuerpos de *N. caninum* en vacas infectadas naturalmente, pueden permanecer en altos niveles después de dos años aunque este aumento puede reflejar, ya sea una reinfección o una reactivación de los parásitos de *N. caninum* enquistados en los tejidos de la madre después de iniciada la infección (Stenlund *et al.*, 1999) y es que también los títulos de anticuerpos aumentan en los 4 a 5 meses antes del parto, aunque Stenlund, *et al.* (1999) mencionan que en vacas infectadas naturalmente los títulos detectados por IFAT alcanzan niveles elevados alrededor del 6° y 8° mes de la gestación (Dubey, 2003b).

Como prueba serológica, el IFAT, puede ser usado rutinariamente para examinar el suero materno y los fluidos pleurales del feto. Se considera reacción positiva con un título de 1/640 en madres que recién abortaron y de 1/64 en fetos (Toolan, 2003).

Las vacas con anticuerpos para *N. caninum* (seropositivas) tienen más probabilidades de abortar que las seronegativas, lo que sugiere la reactivación de la infección latente, aunque se sabe poco de cualquier mecanismo de reactivación en bovinos (Dubey, 1999b, 2003a, b)

En los rebaños de bovinos, tanto en el ganado de carne como de leche, los abortos por *N. caninum* pueden diagnosticarse por la presencia de anticuerpos, y estadísticamente entre la seropositividad de las madres y el aborto (Schaes *et al.*, 2000). Sin embargo, más del 95% de los becerros vivos se infectan congénitamente de vacas seropositivas que permanecen clínicamente normales (Dubey, 2003b), pero los abortos asociados con *N. caninum* no deben ser excluidos de vacas o vaquillas seronegativas (Sager *et al.*, 2001).

Bajo condiciones definidas cuando se utiliza Western blot, los organismos estrechamente relacionados como *T. gondii*, *S. spp*, *Cryptosporidium parvum* y especies de *Eimeria* no muestran reacción cruzada con *N. caninum* usando sueros

de muestras sanguíneas de ganado infectado experimentalmente (Dubey *et al.*, 1997; Wouda *et al.*, 1998) aunque Howe *et al.*, (2002) mencionan que las pruebas serológicas para identificar la neosporosis se complican por el potencial de reacción cruzada de los anticuerpos para antígenos que son similares entre *N. caninum* y por su estrecha relación con *T. gondii* y *S. cruzi*.

Los antígenos de superficie en parásitos *Apicomplexa* son frecuentemente inmunodominantes y son de interés particular con propósitos de diagnóstico (Schaes *et al.*, 2000). Por ejemplo, un antígeno de superficie con 38 -KDa parece estar presente en el taquizoíto, pero no en el estadio de bradizoíto y, aún cuando los antígenos 33 KDa de los gránulos densos pueden ser encontrados tanto en taquizoítos como en bradizoítos, la expresión de uno de los antígenos superficiales, el antígeno 38 - KDa, parece estar restringido al estadio de taquizoítos de *N. caninum* (Bjorkman *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 1999). Además, la especificidad de la reacción como P38, y la naturaleza inmunodominante del antígeno sugiere que p38 es un candidato ideal para el desarrollo de la sensibilidad y la especificidad de las pruebas serológicas (Schaes *et al.*, 2000).

Desventajas de las pruebas de laboratorio

Una de las limitantes de muchas pruebas serológicas para *N. caninum* es que no pueden diferenciar una infección aguda de una latente o de una crónica (Jenkins *et al.*, 2002).

En los fetos, la presencia de un anticuerpo para *N. caninum* puede establecer un diagnóstico de la infección, pero un resultado negativo es menos informativo debido a que la síntesis de anticuerpos en el feto es dependiente del estado de gestación, del nivel de exposición y de tiempo transcurrido entre la infección y el aborto (Dubey, 2003a), además de que muchos fetos son inmunológicamente inmaduros (< 5 meses de edad de gestación) o están momificados (Dubey *et al.*, 1997).

13.1.4. Lesiones

Las lesiones fetales típicas histológicas, pero no patognomónicas, incluyen encefalitis protozoárica multifocal necrótica, no supurativa (Baszler *et al.*, 1999; Dubey, 1999b, 2003b; Jenkins *et al.*, 2002; Reichel, 2000; Toolan, 2003; Tranas *et al.*, 1999) que se localiza particularmente en la materia gris de la médula espinal (Anderson *et al.*, 2000) y además de miocarditis y necrosis focal en el hígado (Baszler *et al.*, 1999; Dubey, 2003b; Jenkins *et al.*, 2002).

En los fetos y bovinos neonatos, las áreas de necrosis multifocales están rodeadas por células inflamatorias que son comúnmente observadas en el cerebro, la médula espinal, el corazón, el pulmón y la placenta, pero además, el músculo esquelético, el hígado y el riñón pueden estar afectados (Dubey, 2003b; Jenkins *et al.*, 2002; Reichel, 2000), señalándose que aunque la neosporosis puede causar lesiones en varios órganos, el cerebro fetal es el tejido más frecuentemente afectado (Dubey, 1999b, 2003b; Toolan, 2003).

El estado cístico tisular persistente, que contienen múltiples bradizoítos rodeados por paredes císticas delgadas, se encuentra en tejido nervioso y explica la reacción inflamatoria mínima (Anderson *et al.*, 2000).

En la neosporosis, las lesiones en miocardio pueden ser más pronunciadas y se asocian casualmente con muerte fetal, pero éstas pueden ser enmascaradas por la autólisis (Reichel, 2000), mientras que la hepatitis es más común en epizootias que cuando son de abortos esporádicos (Dubey, 1999b, 2003b), y aunque las lesiones pueden estar presentes en la placenta, los parásitos son difíciles para encontrar en ellas (Dubey, 2003a).

Las formas de esquizontes de *S. cruzi* en el endotelio vascular son raramente encontradas (< 0.1%) en cerebros de fetos abortados, mientras que *N. caninum* es usualmente localizado en el tejido extravascular (Dubey, 2003a). Además, las

formas asexuales del parásito: taquizoítos, bradizoítos y quistes tisulares se han identificado en fetos abortados, en becerros y en otros hospederos intermediarios (Anderson *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 1999).

En un estudio realizado por Park, *et al.*, (2000) se demostró que un examen histológico de ratón reveló numerosos grupos de taquizoítos en el páncreas, estómago, intestino delgado, así como en el sistema nervioso central y músculo esquelético. Ratones no infectados inoculados intraperitonealmente con contenido intestinal infectado presentaron signos clínicos y una proliferación de taquizoítos de *N. caninum* en la mucosa del tracto digestivo y páncreas (Park *et al.*, 2000).

13.1.5. Patogénesis y aborto

N. caninum induce abortos y fetos nacidos muertos afectando al ganado lechero y de carne (Dubey, 1999a), y aunque, actualmente, no se conoce con precisión el mecanismo del aborto causado por este parásito después de la ingestión de ooquistes (Bjorkman *et al.*, 2000; Calzada *et al.*, 2002; Dubey, 2003a; Stenlund *et al.*, 1999), se ha supuesto que los taquizoítos presentes en forma latente en los tejidos de las vacas, son capaces de multiplicarse activamente en la placenta y en los tejidos de los fetos, provocando el aborto (Bjorkman *et al.*, 1999; Calzada *et al.*, 2002; Nishikawa *et al.*, 2002b; Tranas *et al.*, 1999).

Los perros alimentados con quistes tisulares pueden eliminar ooquistes no esporulados (Dubey, 1999b) que después son consumidos por hospederos intermediarios donde bajo condiciones optimas esporulan dentro de las 24 horas o en tres días, desarrollándose dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoitos (Lindsay *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2003) que son liberados e infestan el intestino delgado, se dividen rápidamente por endodiogenia y se transforman en taquizoítos, con lo cual pueden infectar el músculo esquelético y cardíaco, el tejido conectivo y el hígado, donde se multiplican. Poco después, los quistes contienen bradizoítos desarrollados y

presentan afinidad por el SNC, nervios periféricos y la retina (Collantes *et al.*, 2002; Dubey, 2003a; Sánchez *et al.*, 2003).

Los taquizoítos también pueden surgir o reactivarse de una infección cerebral latente por la ingestión de los ooquistes de *N. caninum* (Jenkins *et al.*, 2002; Tomioka *et al.*, 2003) e infecta al feto a través de la placenta por vía sanguínea; además, se diseminan a través del cuerpo e invaden a las células de una variedad de órganos ocasionando un daño tisular (Anderson *et al.*, 2000). Sin embargo, se conoce poco sobre la formación de quistes tisulares de *N. caninum* en cualquier hospedero intermediario (Dubey, 1999b; Dubey *et al.*, 1998a), pero se han encontrado en nervios periféricos del caballo y ocasionalmente en el músculo ocular de un potro infectado congénitamente y en el cerebro de ratones inoculados parenteralmente a los 17 días postinoculación (Dubey, 1999b).

Se sabe poco sobre la infectividad de los quistes tisulares y taquizoítos en carnívoros por ingestión o por inoculación oral, aunque McAllister *et al.*, en 1998 reportaron que los quistes tisulares derivados de un ratón infectado experimentalmente, no infectaban a gatos cuando se les inoculaba oralmente (Dubey, 1999b), mientras que los fetos inoculados con taquizoítos de *N. caninum* en forma parenteral se infectan después de 4 semanas postinoculación (Dubey, 1999b, 2003a).

La etapa de gestación puede determinar el resultado de la infección, ya que los fetos infectados en los primeros meses de preñez son más susceptibles de morir (Dubey, 2003b).

Los cambios patológicos en la placenta inducidos por virus de la Diarrea Viral Bovina pueden permitir en que otros patógenos crucen tempranamente la barrera feto-maternal o provocan inmunosupresión por la ingestión de micotoxinas puede ser un factor contribuyente en los brotes de aborto por *N. caninum* (Bjorkman *et al.*, 2000).

13.1.6. Respuesta inmunológica a la infección con *Neospora*

Es una consecuencia clínica de la infección trasplacentaria fetal de *N. caninum* es determinada por la respuesta inmune materna y fetal, incluyendo la respuesta humoral y celular (Anderson *et al.*, 2000; Andrianarivo *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 2002b)

La inmunidad mediada por células es la principal respuesta inmunológica protectora contra infecciones causadas por protozoarios parásitos intracelulares, incluyendo a *T. gondii* (Anderson *et al.*, 2000; Andrianarivo *et al.*, 2000), cuya resistencia está asociada a una respuesta inmune de Linfocitos T auxiliares tipo 1, mediada por las citoquinas, el interferón gamma (IFN - γ), interleucinas 12 (IL-12) e interleucinas 2 (IL-2) (Anderson *et al.*, 2000).

El interferón se divide en dos tipos I y II. El interferón- α - β y - γ son miembros del tipo I mientras que el IFN- ω es del tipo II (Nishikawa *et al.*, 2001).

Mientras que el tipo citosina IFN - γ 1 estimula la producción de anticuerpos IgG2, la citosina IL- 4 2 regula la producción de anticuerpos IgG1 en células B in vitro reportándose un desbalance entre la producción de citocinas tipo 1 y 2 posiblemente IL- 4, en estos fetos, lo cual puede afectar su habilidad para resolver la infección (Anderson *et al.*, 2000).

En el ratón, la inmunidad a *N. caninum* está parcialmente mediada por la IL-12 y el interferón gamma. De esta forma, se puede separar el interferón gamma y hacerlo comercialmente disponible, para ser usado aislándolo de tejidos de animales infectados naturalmente (Dubey, 1999b).

El interferón - α y - β , juega un papel importante para el crecimiento de *N. caninum* en células hospederas (Nishikawa *et al.*, 2001). Estos miembros α y β , las células del bazo de ratones infectados producen inicialmente interleucina 12 (IL- 12), y después IFN - γ . Estas dos citocinas son aparentemente importantes en la protección natural contra la infección (Nishikawa *et al.*, 2002b).

Una inoculación experimental elevada por vía subcutánea combinada con intramuscular e intravenosa de taquizoítos de *N. caninum* en vacas no preñados provocó una respuesta inmunológica celular no específica, determinada por una respuesta linfoproliferativa y por la producción de interferón gamma (Anderson *et al.*, 2000). A su vez, los becerros infectados oralmente con ooquistes de *N. caninum* de perros, desarrollan una respuesta linfoproliferativa específica a *Neospora* (Anderson *et al.*, 2000).

Las consecuencias de la infección por *Neospora* en fetos de bovinos dependen de la edad gestacional del feto, de la competencia inmune y del tiempo de la infección de la madre (Anderson *et al.*, 2000), ya que hay un desarrollo de la inmunidad que reduce o previene abortos después de la primera infección en el ganado. Esta inmunidad aparente es más efectiva en vacas infectadas con ooquistes de origen exógeno que en vacas que recaen de una infección endógena, por lo tanto, las vacas adquieren inmunidad después que se han infectado naturalmente (Dubey, 2003b), aunque la infección por *N. caninum* no siempre produce una inmunidad que proteja bien contra la infección fetal y el aborto (Toolan, 2003).

Se han identificado muchas proteínas superficiales de *N. caninum*, incluyendo Nc-p43, p29, p35 y p38, aunque sus funciones no han sido bien aclaradas, sin embargo, existe una evidencia indirecta que al menos uno de estos antígenos, Nc-p43, está involucrado en la fijación del parásito a las células hospederas (Schaes *et al.*, 1999; Son *et al.*, 2001). Además, se sabe que el gen Nc-p43 de la cepa Coreana de *N. caninum* (KBA-2) en la bacteria, tiene un dominio antigénico de Nc-

p43 que se localiza en la C- terminal de las 2/3 partes de la molécula (Ahn *et al.*, 2003)

Recientemente, se identificó un antígeno superficial (Nc - p43) que juega un papel importante en la adhesión e invasión de células hospederas por taquizoítos de *N. caninum* y determinados por anticuerpos policlonales (Schaes *et al.*, 1999; Tomioka *et al.*, 2003).

La caracterización de los antígenos de *N. caninum* son un importante prerrequisito para detallar los análisis de la respuesta inmune de animales infectados y para el desarrollo de herramientas diagnósticas seguras (Schaes *et al.*, 1999), y aunque se conoce que la superficie de las proteínas de los parásitos *Apicomplexa* a menudo es inmunodominante y parece tener un interés particular como una herramienta de diagnóstico o como antígenos vacunales (Son *et al.*, 2001), es importante conocer en su totalidad la respuesta inmune para continuar la investigación de vacunas efectivas contra *N. caninum* (Nishikawa *et al.*, 2002b).

Se desconoce como los factores fisiológicos de los hospederos (citocinas, y las hormonas esteroidales) pueden contribuir a la patogénesis de la infección por *N. caninum* (Dubey, 2003a); no obstante Kobayashi *et al.*, (2002) reportan que los niveles fisiológicos de hormonas esteroides (progesterona, 17- β estradiol y corticosterona) no reactivan a *N. caninum*, ya que éstas no tienen efecto directo en el crecimiento del parásito *in vitro* en ratones (Kobayashi *et al.*, 2002).

13.1.7. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico de los fetos puede ser enmascarado por agentes infecciosos o no infecciosos conocidos como abortivos; por ejemplo: los virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y el de la Diarrea Viral Bovina (DVB), además de *Leptospira spp.*, *Brucella abortus*, *Campylobacter* y *Chlamydia psittaci* (Andrianarivo *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 2002). Por otra parte, la presencia de *N.*

caninum en el feto no es evidencia concluyente de que este parásito cause el aborto (Jenkins *et al.*, 2002).

T. gondii y *S. cruzi* son dos protozoarios que también deben ser considerados en el diagnóstico diferencial de aborto en bovinos (Dubey, 2003a) ya que *S. cruzi* puede causar lesiones similares a las de los fetos abortados por *Neospora* (Jenkins *et al.*, 2002).

Mientras que las pruebas para bacterias abortivas comunes (como *Salmonella dublin* o *Leptospira hardjo*) son negativas, se puede sospechar de *N. caninum*. El hallazgo de *N. caninum* en fetos abortados puede ser incidental y la causa del aborto puede ser bacteriana tanto por la *Salmonella* como la *Leptospira* o no ser diagnosticado (Toolan, 2003).

13.1.8. Epidemiología en el ganado

Los abortos por *N. caninum* en los hatos de todo el mundo pueden ser esporádicos, endémicos o epidémicos (Bjorkman *et al.*, 2000; Dubey, 1999b, 2003b; McAllister *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 2000), existiendo una relación entre neosporosis en el ganado lechero (formas epidémicas y endémicas) y el número de perros en los hatos (McAllister *et al.*, 2000).

La infección aguda por *N. caninum* ha sido implicada como la causa de aborto epidémico en vacas lecheras (Bjorkman *et al.*, 2000), existiendo reportes epidemiológicos sobre abortos bovinos en varias regiones del mundo, que indican que las infecciones por *N. caninum* provocan de un 3 a 42% de abortos en hatos lecheros en los que las causas han sido diagnosticadas (Baszler *et al.*, 1996).

La edad de la madre, el número de lactación y la historia de abortos no afectan el índice de infección congénita (Dubey, 2003a), además de que una pequeña

proporción de vacas (menos del 5%) pueden presentar nuevamente abortos debido a la neosporosis (Dubey, 2003a).

En hatos infectados endémicamente, el aumento anual en el índice de abortos puede ser consecuencia de la propagación de la infección trasplacentar y postnatal por ingestión de ooquistes, los que juegan un papel muy importante en la epidemiología de la neosporosis bovina (Lindsay *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 2001). Al respecto, se reconoce que en los EUA, Nueva Zelanda, Alemania el 12 al 42% y Países Bajos 17% de los fetos abortados de vacas lecheras son infectados con *N. caninum* (Dijkstra *et al.*, 2001a; Dubey, 1999a, 2003b) y aproximadamente el 25% de abortos en el ganado lechero de California, EUA (Dubey, 1999a). Aunque, Australia tiene el estatus de principal productor de ganado de carne se conoce poco acerca de la epidemiología de *N. caninum* (Stoessel *et al.*, 2003). Sin embargo, se reconoce que *N. caninum* es endémico en hatos de ganado productor de carne en la Isla de Queen Central (Stoessel *et al.*, 2003).

Un brote de neosporosis en un hato de bovinos productores de carne indican que una epidemia de abortos y nacimientos prematuros son el resultado de una exposición de un gran número de animales susceptibles a *N. caninum* durante un periodo breve, usualmente a través de la ingestión de agua y de raciones contaminadas con ooquistes del parásito durante el 5° o 6° meses de gestación (Dubey, 2003a; McAllister *et al.*, 2000).

13.1.9. Impacto económico

Se ha reportado a la infección por *N. caninum* como una causa importante de pérdidas económicas en hatos de bovinos productores de leche y de carne en todo el mundo (Baszler *et al.*, 2001; Howe *et al.*, 2002) principalmente por los abortos y a la eficiencia reproductiva reducida, ya que reducen la producción de leche, incrementan las vacas de desecho y una deficiencia en el consumo de

alimento (Baszler *et al.*, 2001) pudiendo extenderse el problema a la salud o bienestar de los humanos (Bae *et al.*, 2000).

El impacto económico de la neosporosis depende de los costos indirectos, así como del valor de las pérdidas de los fetos. Los costos indirectos incluyen la ayuda profesional y los costos asociados con el establecimiento de diagnóstico, la nueva gestación, el incremento en el tiempo de lactación, las posibles pérdidas en la producción de leche y los costos de reemplazo de vacas que abortaron (Dubey, 1999b, 2003b).

Por su impacto económico negativo, el aborto en bovinos es uno de los problemas más críticos en la industria del ganado lechero en todo el mundo (Kim *et al.*, 2002b; Toolan, 2003), los costos de la neosporosis en la industria lechera causa pérdidas anuales de millones de dólares en el ganado de California (USA), Nueva Zelanda, los Países Bajos, Canadá y otros países (Antony, 2001). Por ejemplo, en Australia el impacto económico de la afección por *N. caninum* en el ganado se ha estimado en 85 millones de dólares por año para la industria lechera y 25 millones de dólares para el ganado de carne y de 17.8 millones de dólares para la industria lechera en Nueva Zelanda (Reichel, 2000).

Reichel (2000) reporta que, en los Estados Unidos de América, hubo una disminución en el rendimiento de leche de aproximadamente 1Kg/día en el ganado que presentaba en sus sueros anticuerpos para *N. caninum* (Reichel, 2000), sin embargo, Dubey (2003a) reporta que las vacas seropositivas, producen la misma cantidad de leche que las seronegativas.

13.2. Neosporosis en otras especies

N. caninum tiene un amplio rango de hospederos intermediarios naturales (Dubey *et al.*, 1999a) como son los bovinos, las ovejas, los caballos, las cabras, las zorras rojas y grises, los coyotes, los mapaches, los venados cola blanca, los búfalos, los

rinocerontes, los camellos y los felinos en los que se han reportado hallazgos de anticuerpos para este parásito que incluyen (Collantes *et al.*, 2002; Dubey, 1999b, 2003b; Reichel, 2000) y de hospederos intermediarios experimentales como son los gatos, ratones, ratas, cerdos, zorros, gerbos y monos (Calzada *et al.*, 2002; Collantes *et al.*, 2002; Dubey, 1999b). Sin embargo, no se sabe si las aves son hospederos intermediarios naturales para *N. caninum*, pero lo pichones domésticos si se han infectado en forma experimental, por lo que, la carne de pollo no puede ser excluida como fuente de infección (Schaes *et al.*, 2001).

Los hospederos intermediarios solo desarrollan los estadios asexuales de el parásito (taquizoítos y bradizoítos enquistados) (Dijkstra *et al.*, 2001a) donde puede llegar a causar aborto, morbilidad y mortalidad neonatal (Lally *et al.*, 1996).

La alta prevalencia de anticuerpos (40%) para *N. caninum* es compatible con un ciclo selvático (que afecta a animales silvestres) de este parásito (Dubey, 2003b; Dubey *et al.*, 1999a).

13.3. Búfalos de agua

Los búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) son importantes para la economía en la agricultura de varios países en desarrollo, especialmente en Brasil, India, Italia Vietnam y el Suroeste de Asia (Dubey, 2003b; Dubey *et al.*, 1998b; Fujii *et al.*, 2001); en estos países, habiéndose reportado que la prevalencia de anticuerpos para *N. caninum* indica que los búfalos han sido expuestos al parásito (Dubey, 2003b).

N. caninum es un abortivo importante para el ganado, pero se conoce poco acerca del papel de este protozoario como causa de aborto en los búfalos de agua de todo el mundo (Dubey, 2003b; Dubey *et al.*, 1998b; Fujii *et al.*, 2001). Aunque, se ha reportado neosporosis clínica y se han encontrado anticuerpos a *N. caninum* en suero de búfalos de agua lo cual amplía la gama de hospederos y el área

geográfica (Dubey, 2003b; Dubey *et al.*, 1998b). Además, Dubey *et al.*, (1998b) reportaron el primer caso de infección por *N. caninum* en búfalos de agua de Egipto.

Con el constante crecimiento del número de búfalos en el sur de Italia que es de 81, 000 cabezas en 1977 a 150 000 en 1998, esta especie tiene ahora una marcada importancia como sector productivo y en particular para la región de Campania (Guarino *et al.*, 2000); sin embargo, se han encontrado quistes tisulares típicos de *N. caninum* en dos de cuatro fetos abortados de búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en Italia (Fujii *et al.*, 2001). También en otros países se ha reportado su presencia, Fujii *et al.* (2001) reportaron anticuerpos de *N. caninum* de Egipto el 68% de búfalos, de Vietnam el 1.5% de búfalos y en granjas del sur de Asia el 34.6%.

La frecuencia de la incidencia de anticuerpos de *N. caninum* observados por NAT, no aumenta con la edad de los animales, sin embargo, por IFAT, se ha observado una asociación entre la edad y la seroprevalencia de neosporosis presentando una incidencia alta en los animales de 6 - 11 años de edad, en contraste, Guarino *et al.*, en el 2000 encontraron que en Italia, la prevalencia de *N. caninum* aumenta con la edad de los búfalos, lo que indica una exposición al parásito (Fujii *et al.*, 2001).

La prueba del IFA es utilizada para detectar la presencia de anticuerpos anti - *N. caninum* en suero de búfalo (Guarino *et al.*, 2000).

13.4. Ovejas

N. caninum fue diagnosticada por primera vez en un cordero infectado en forma congénita en Inglaterra, siendo este el primer registro de una infección de *Neospora* en rumiantes (Dubey, 2003b).

También se reportó un caso clínico de neosporosis en Japón (Dubey, 2003b).

El cordero puede nacer débil particularmente atáxico y morir a la semana de edad y al examen microscópico observar lesiones como la reducción unilateral de la materia gris (Dubey, 2003b).

Las ovejas pueden infectarse en forma oral con ooquistes de *N. caninum*, pero también son altamente susceptibles a una infección experimental con taquizoítos, lo que las convierte en un modelo alternativo de neosporosis en bovinos (Dubey, 2003b).

13.5. Cabras

Se han reportado abortos y mortalidad neonatal asociados a *N. caninum* en cabras pigmeas de los EUA; y en un hatos de cabras lecheras en Costa Rica y en Brasil. Sin embargo, se conoce poco sobre la seroprevalencia de anticuerpos de *N. caninum* en cabras (Dubey, 2003b).

Se conoce que las cabras pigmeas son altamente susceptibles a la infección experimental de *N. caninum* y que cuando son inoculadas con este parásito durante la preñez, abortan fetos infectados (Dubey, 2003b).

13.6. Caballos

La neosporosis clínica en caballos sólo se ha reportado en los Estados Unidos de América, mientras que las infecciones por *N. caninum* en otras especies sí ha sido reportada en varios países (Dubey *et al.*, 1999b). Aunque se conoce poco sobre la prevalencia de anticuerpos en caballos con infección subclínica (Dubey *et al.*, 1999b).

Dubey, *et al.*, (1999b) reportan que el 21.3% de 296 caballos muestreados en EUA presentaron anticuerpos contra *N. caninum* y que por el contrario, en Argentina se encontró una baja prevalencia de anticuerpos contra la infección para ésta especie. En ambos casos se usó la prueba de aglutinación de *Neospora* (Dubey, 1999b; Dubey *et al.*, 1999b).

13.7. Humanos

Ni se han detectado o reportado casos de *N. caninum* en el suero de mujeres con antecedentes de abortos (Petersen *et al.*, 1999; Reichel, 2000). Los primates sólo se infectan experimentalmente ocasionándoles una infección fatal, y actualmente, no hay evidencia que los humanos se infecten por *N. caninum* (Dubey, 2003a; Nam *et al.*, 1998; Petersen *et al.*, 1999). Además, no es evidente la infección zoonótica de *N. caninum* (Dubey, 2003b)

Después de la infección intramuscular e intravenosa de sus madres con taquizoítos e inducir una encefalitis fetal, los primates no humanos pueden ser susceptibles a la infección por *N. caninum* por inoculación intrauterina o por diseminación trasplacentar (Reichel, 2000; Tranas *et al.*, 1999)

No se han descrito casos de infección por *N. caninum* en humanos (Tranas *et al.*, 1999). Sin embargo, por su estrecha relación filogenética con *T gondii* y a un amplio rango de hospederos potenciales la posibilidad de infección en humanos no puede ser excluida (Petersen *et al.*, 1999), pues el potencial de exposición a *N. caninum* es grande, debido a su estrecha convivencia con los perros y hasta es posible que algunos casos de neosporosis hayan sido confundidos o mal diagnosticados con Toxoplasmosis (Tranas *et al.*, 1999).

13.8. Gatos

Los gatos son considerados hospederos para tres *Apicomplexas* relacionados: *T. gondii*, *Sarcocystis neurona* y *N. caninum*. Estos parásitos tienen una amplia gama de hospederos, y existen numerosos estudios epidemiológicos que afirman el papel esencial de los gatos en el ciclo biológico de *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2002).

N. caninum puede ser transmitido en forma trasplacentaria en gatos durante un estado de infección aguda y crónica, y se ha demostrado que si hay evidencias de anticuerpos de IgG específica a *N. caninum* en suero de gatos y sus cachorros inoculados, (Dubey y Lindsay, 1989) encontrándose recientemente, que los gatos son un hospedero intermediario para *S. neurona*, que es una causa importante de enfermedades neurológicas de caballos (Dubey *et al.*, 2002).

Cheadle *et al.* 1999 reportaron seropositivo a *N. caninum*, a un pequeño grupo de felinos silvestres de África. Los investigadores encontraron títulos bajos (1:50 - 1:200) de anticuerpos fluorescentes en 3 de 8 leones (*Pantera leo*) del Parque Nacional de Kruger en Sudáfrica y 1 de 6 chitas (*Acinonyx jubatus*) de Namibia (Dubey *et al.*, 2002), por lo que, es un hecho que la neosporosis clínica si afecta a los felinos (Dubey, 2003b).

13.9. Fauna silvestre

Se ha reportado la presencia de *N. caninum* en varios animales considerados como fauna silvestre, dentro de los reportes al respecto resaltan los siguientes: los hamsters *Djungarian* son susceptibles a la infección con ooquistes y taquizoítos de *N. caninum* (Dubey, 2003b; Uchida *et al.*, 2003) y una vez afectados pueden presentar ataxia y encontrándose muchos quistes tisulares en cerebro y raras veces en la túnica muscular del estómago (Uchida *et al.*, 2003).

Los gerbos también son susceptibles a la infección con ooquistes de *N. caninum* (Walsh *et al.*, 2000). En otros animales, como los coyotes y los camellos se han reportado neosporosis clínica ya que se han encontrado anticuerpos a *N. caninum* (Dubey, 2003b).

La neosporosis fue diagnosticada a la necropsia en dos venados cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) de vida silvestre encontrados muertos en California y en venados cautivos en zoológicos (Dubey, 2003b), por lo que, los venados cola blanca se consideran un nuevo hospedero para la infección por *N. caninum* (Dubey, 2003b; Dubey *et al.*, 1999a).

La falta de asociación entre la seroprevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* y la edad del ciervo, sugiere que se transmite congénitamente en forma similar a la infección en bovinos (Dubey *et al.*, 1999a), además de que, la alta prevalencia de anticuerpos en ésta especie es compatible con un ciclo selvático (que afecta a animales silvestres) de este parásito (Dubey *et al.*, 1999a).

Dubey *et al.* 1996; Peterson *et al.* 2001, reportaron mediante PCR, anticuerpos de *N. caninum* en el fluido fetal y el ADN, en tejidos de cerebro, corazón, pulmones, hígado e intestinos de dos crías de antílopes gemelos (*Tragelaphus imberberis*) en un zoológico de Hannover, Alemania (Dubey, 2003b).

Por último, se han reportado neosporosis en crías de rinocerontes (*Ceratotherium simum*) (Dubey, 2003b), y también se han observado ooquistes similares a los de *N. caninum* en zorras rojas y grises (Dubey, 2003b; Schares *et al.*, 2001) indicando una alta seroprevalencia (Dubey, 2003b), además de que las zorras rojas de campo son hospederos intermediarios naturales de *N. caninum* (Scharés *et al.*, 2001) pues se han encontrado anticuerpos para éste en su suero; sin embargo, no han sido confirmadas por infecciones experimentales (Scharés *et al.*, 2001).

14. Hospedero definitivo

La neosporosis se reconoce como una causa importante de parálisis y mortalidad en perros de todo el mundo (Dubey *et al.*, 1998a; Lally *et al.*, 1996), además de que estos pueden ser vistos como fuentes potenciales de la infección al ganado (Toolan, 2003).

La neosporosis se identificó por primera vez en perros con Encefalomiелitis. Recientemente, se ha encontrado que en el perro doméstico (*Canis familiaris*) que es en el que ocurre el desarrollo sexual actuando como hospedero definitivo de *N. caninum*, los perros adquieren la infección por ingestión de tejidos infectados con quistes tisulares, para luego eliminar ooquistes no esporulados resistentes al medio ambiente a través de las heces fecales. Sin embargo, todos los aspectos relacionados con la transmisión del parásito a los fetos no es conocido (Antony, 2001; Baszler *et al.*, 2001; Bjorkman *et al.*, 2000; Dijkstra *et al.*, 2001a; Dubey, 1999b, 2003b; Dubey *et al.*, 1999a; Gennari *et al.*, 2002; Lindsay *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 1998; Sánchez *et al.*, 2003; Schares *et al.*, 1999; Schares *et al.*, 2000; Stenlund *et al.*, 1999).

El perro puede actuar tanto como hospedero definitivo como intermediario de *N. caninum* (Dubey, 1999b; Toolan, 2003), no obstante, parece ser que el número de ooquistes eliminados en las heces de los perros es baja (Reichel, 2000), por lo que, se cree que el perro doméstico no puede ser el único hospedero definitivo (Reichel, 2000; Toolan, 2003). De esta manera, es posible que los cánidos salvajes, como zorras y coyotes, estén involucrados como tales (Toolan, 2003), sin embargo, no se sabe que otros carnívoros silvestres puedan servir como hospedero definitivo de *N. caninum* (Antony, 2001) o que las presas pequeñas, consumidos por los perros cazadores, sean los portadores de *N. caninum* (Dubey, 2003b), aunque, un estudio reciente reporta que se ha descubierto que los coyotes

son el segundo hospedero definitivo de *N. caninum* después de los perros (Gondim *et al.*, 2004).

No se conoce la influencia de la edad del perro, su raza y su estado inmunológico en la excreción de ooquistes (Lindsay *et al.*, 1999), pero si, que los perros excretan después de un periodo latente de cinco días (Gennari *et al.*, 2002; Lindsay *et al.*, 1999) y por lo tanto, son los reservorios de la infección para el ganado, ya que éste se infecta por la exposición a los ooquistes de *N. caninum* (Reichel, 2000; Sánchez *et al.*, 2003; Toolan, 2003).

14.1.1. Prevalencia y distribución

La mayoría de los casos de neosporosis ocurre en animales jóvenes. En los cachorros se presenta la infección congénita que puede ser clínicamente severa, pero su prevalencia es desconocida (Dubey, 2003b; Gennari *et al.*, 2002), y se reporta que las infecciones clínicas y subclínicas en perros son mundiales (Gennari *et al.*, 2002).

En perros, se han reportado tasas de prevalencia para *N. caninum* en diferentes países: Argentina, 37.8%; Nueva Zelanda, 22%; Turquía, 10%; Brasil, 6.7% en perros callejeros y el 21.6% en perros de áreas rurales; Italia, 64%; Chile, 12% en zonas urbanas y 26% en zonas rurales; y en Alemania, el 4% y en perros con signos el 13% (Dubey, 2003b).

También se reporta para Japón el 31% de perros de granjas lecheras y en el 7% de perros de áreas urbanas; en los Países Bajos, el 23.6% en perros de granja y el 5.5% en perros urbanos (Dubey, 2003b).

Los anteriores reportes indican una diferencia en la prevalencia de acuerdo al sitio en que viven los perros, así, la prevalencia de anticuerpos para *N. caninum* en perros callejeros es 2.5 veces más frecuente que en perros que tienen dueño

indican por lo que hay una mayor probabilidad en los perros callejeros de ser infectados (Gennari *et al.*, 2002).

14.1.2. Epidemiología

Aunque se conoce poco con respecto a la epidemiología natural de la infección por *N. caninum* (Gennari *et al.*, 2002). Los perros son importantes en la misma debido a que son los únicos hospederos definitivos conocidos que excretan ooquistes de *N. caninum* (Canon *et al.*, 2003) y por lo tanto existe una interrelación positiva de la neosporosis entre perros y bovinos (Canon *et al.*, 2003).

14.1.3. Signos clínicos

Una revisión reciente de Dubey *et al.* (1999b) indica que muchos de los casos clínicos de neosporosis en perros fueron de animales jóvenes infectados congénitamente, en los que los signos clínicos fueron más severos en perros con signos neuromusculares (Dubey, 1999a, b).

La neosporosis puede tener predisposición por razas a diferencia de la susceptibilidad por sexo, la cual no se conoce reportándose esta susceptibilidad en perros de raza como el Retriever, el Labrador, el Boxer, el Greyhound, el Golden retriever y el Basset hound (Dubey, 2003b).

Los perros de cualquier edad pueden ser afectados, pero es más frecuente en los adultos de 8 a 15 años, la neosporosis suele ser fatal porque en ellos la diseminación de la infección es más común (Dubey, 2003b; Reichel, 2000).

En la mayoría de los casos clínicos en perros, existen signos neurológicos progresivos que incluyen paresia o parálisis ascendente y progresiva de los miembros posteriores, los que afecta principalmente a perros de menos de 6

meses de edad, pudiendo en este caso ser sugestivos de la infección por *N. caninum* (Dubey, 2003b; Petersen *et al.*, 1999; Reichel, 2000)

Una característica sobresaliente de los casos de parálisis de los miembros posteriores es el severo parasitismo con la presencia de grandes cantidades de taquizoítos (Dubey, 1999b) en los que los animales pueden sobrevivir por meses y ser una fuente de infección (Dubey, 2003b), habiéndose reportado que en el Amazonas, la neosporosis debe ser incluida en el diagnóstico diferencial de los trastornos neurológicos en los perros en esa área (Canon *et al.*, 2003).

Los signos neurológicos dependen del sitio parasitado siendo las extremidades anteriores más afectadas que las posteriores y algunas veces se presenta una hiperextensión rígida. Otras disfunciones que pueden incluirse son la dificultad para deglutir, parálisis de la mandíbula, flacidez del músculo, atrofia muscular, falla cardíaca, miocarditis, dermatitis y neumonía (Dubey, 2003b; Reichel, 2000).

La enfermedad puede ser local o generalizada y virtualmente todos los órganos incluyendo la piel pueden estar involucrados (Dubey, 2003b), aunque ésta sea una presentación inusual de la neosporosis (Dubey, 1999b). La dermatitis por neosporosis puede ser severa, conteniendo enormes cantidades; sin embargo, solo se han reportado 4 casos de neosporosis cutánea con infección sinérgica de *Leishmania spp* en un perro (Dubey, 2003b).

Los perros con infección subclínica pueden transmitir el parásito a sus fetos y las camadas sucesivas de algunos perros, pueden nacer infectadas (Dubey, 2003b).

14.1.4. Diagnóstico

De acuerdo a los signos clínicos que se presentan en perros por *N. caninum*, se puede hacer el diagnóstico diferencial respecto a otros desórdenes neurológicos que los afectan, en especial en cachorros (Dubey, 1999a).

El diagnóstico en perros se basa usualmente en los signos clínicos, auxiliado por serología IFAT, la que ha sido muy usada para el diagnóstico de neosporosis canina con títulos altos ($\geq 1:800$) indicando a menudo una infección aguda (Dubey, 1999b). La técnica de PCR da un diagnóstico específico, que también puede ser confirmado post-mortem, por necropsia, histología, inmunohistoquímica y otras técnicas moleculares (Dubey, 1999b; Reichel, 2000), por el aislamiento del parásito en cultivo celular y de ratón, y por la demostración directa de quistes tisulares en el cerebro de perros (Dubey *et al.*, 1998a).

El método del IFA permite el análisis de un gran número de muestras en corto tiempo, es rápido, seguro y específico; y fue la primer prueba utilizada para diagnosticar neosporosis en el perro (Guarino *et al.*, 2000). Sin embargo, las pruebas serológicas para fluidos corporales fetales pueden dar falsos negativos con fetos infectados inmunodeprimidos por no producir cantidades significativas de anticuerpos para *Neospora* (Reichel, 2000).

Las heces de caninos pueden ser examinadas por flotación en sacarosa para observar ooquistes y así enviarlas a un laboratorio especializado para la identificación de las especies (Toolan, 2003); sin embargo, Mc Allister *et al.* (1998) demostraron que los perros excretan ooquistes por 1 a 3 meses; por lo tanto, es incierto que los ooquistes puedan ser demostrados en las heces de perros durante el tiempo que transcurre para que ocurra el aborto en los bovinos (Toolan, 2003).

En el ratón, la inmunidad a *N. caninum* es parcialmente mediada por la IL-12 e interferón gamma. De esta forma, se puede separar el interferón gamma y haciendo comercialmente disponible para ser usado para el aislamiento de *N. caninum* a partir de tejidos animales infectados naturalmente (Dubey, 1999b).

Los fetos abortados frecuentemente no están disponibles o están en etapas avanzadas de autólisis lo que hace más difícil el diagnóstico histológico (Reichel, 2000).

14.1.5. Prevención y control

El control de la infección se enfoca en reducir el número de vacas infectadas en el hato, en limitar la introducción al mismo de reemplazo infectado (Anderson *et al.*, 2000), emplear medidas de control que se enfoquen a programas para reducir el número de animales infectados congénitamente en el hato, las membranas fetales, los becerros muertos (Dubey, 1999b), y se debe prevenir que los perros ingieran la placenta de vacas infectadas para evitar la infección con *N. caninum*, la cual puede conducir a la eliminación de ooquistes y representan una fuente de infección horizontal para los bovinos para minimizar la oportunidad de transmisión trasplacentaria (Anderson *et al.*, 2000) (Dijkstra *et al.*, 2001b).

Se ha perseguido el desarrollo de vacunas pero actualmente no hay disponible una vacuna que prevenga la dispersión de ooquistes en perros o los abortos en vacas (Dubey, 1999a, 2003b; Reichel, 2000), aunque, en Estados Unidos existe una vacuna de material muerto para su uso en bovinos (McAllister *et al.*, 2000), pero no se tiene información sobre su eficacia en vacas infectadas respecto a la reducción de la infección fetal o el aborto o en vacas no infectadas respecto a la prevención de la infección postnatal (Anderson *et al.*, 2000).

Andrianarivo, *et al.*, (2000) reportaron que después de su administración vía i.v/i.m el POLYGEN, - (preparación de taquizoítos muertos de *N. caninum*), fracasó en el intento de prevenir la transmisión uterina de *N. caninum* en ganado preñado desafiando a la exposición con una dosis total de 4×10^7 taquizoítos (Andrianarivo *et al.*, 2000).

En las vacas no es probable que *N. caninum* se transmita en forma venérea o por transferencia de embriones, por lo que, esta forma se recomienda como método de control para prevenir la transmisión vertical (Dubey, 2003b).

La incorporación de un adyuvante CpG al DNA del plásmido que codifica para el antígeno NcGRA7 duplica el nivel de protección contra la transferencia congénita de *N. caninum* (Jenkins *et al.*, 2004).

Otra estrategia de prevención, incluye el uso del IFNs, debido a su naturaleza funcional así como sus efectos de inmunomodulador y antiproliferativo, por lo que se aplica clínicamente contra un gran número de enfermedades (Nishikawa *et al.*, 2001). Por otra parte, en los perros el nivel de protección se considera alto en cachorros nacidos de madres inmunizadas con un plásmido recombinante (Jenkins *et al.*, 2004).

14.1.6. Tratamiento

No hay medicamentos ni vacunas probadas para eliminar o destruir los quistes tisulares de *N. caninum* (Dubey, 1999a), aunque, las sulfonamidas, las piretaminas y la clindamicina son fármacos que se han usado con resultados alentadores y que pueden ser utilizados para el tratamiento de la neosporosis canina (Dubey, 1999b; Dubey *et al.*, 1998a).

Los fármacos antiprotozoarios son benéficos en perros con neosporosis clínica (Dubey *et al.*, 1998a), pero el decoquinato, que es un anticoccidiano elaborado a partir de cultivos celulares de taquizoítos de *N. caninum*, no es un fármaco efectivo contra los quistes tisulares de *N. caninum* (Dubey, 1999b).

15. *Neospora hughesi* como nueva especie

Marsh et al en 1998, propusieron para el parásito de caballos que habían reportado en 1996, el nuevo nombre de *N. hughesi*; años más tarde se reportaron infecciones por *N. hughesi* en varios equinos: en un potro abortado, en un potro infectado congénitamente, en un caballo de 10 años de edad, en un caballo de 19 años con enfermedad de Cushing's, en un caballo de 20 años con tumor en la pituitaria, y en un caballo cuarto de milla de 11 años castrado (Dubey, 1999b, 2003b).

N. hughesi se ha descrito como una nueva especie del género de *Neospora*, basado principalmente en diferencia moleculares con la especie *N. caninum* (Dubey, 1999b), éste parásito es la causa de la mieloencefalitis equina(EPM) (Walsh et al., 2000).

15.1. Morfología

N. hughesi es morfológicamente similar pero ultraestructural, antigénica y genómicamente diferente a *N. caninum* (Walsh et al., 2000), pero son similares en el gen ribosomal. Sin embargo, en el gen ITS1, *N. hughesi* tiene siete nucleótidos diferentes a *N. caninum*, y se han encontrado diferencias no estructurales en aislamientos de *Neospora* en perros y bovinos, confirmadas tempranamente por Holmdalh et al., 1997 (Dubey, 1999b).

Los quistes tisulares de *N. hughesi* son más pequeños que los de *N. caninum*, con paredes más delgadas (< 1.0 µm de grosor), y sus bradizoítos son más pequeños que los de *N. caninum* (Dubey, 1999b, 2003b).

15.2. Lesiones

Los microorganismos de *N. hughesi* se han encontrado en el cerebro y médula espinal, pero en algunos casos se han hallado en nervios periféricos, músculo del ojo, intestino o en el feto abortado (Walsh et al., 2000).

15.3. Ciclo biológico

Se conoce poco acerca del ciclo biológico o la prevalencia de *N. hughesi* en la cual, los perros no son los hospederos definitivos (Walsh *et al.*, 2000).

15.4. Modelo experimental

Los gerbos expuestos a la infección por *N. hughesi* no mueren ni muestran signos clínicos, siendo también los ratones, resistentes a la infección (Walsh *et al.*, 2000).

15.5. Signos clínicos

Los signos clínicos en los casos de *N. hughesi* son variables e incluyen anemia, ceguera, pérdida de peso, parálisis de los miembros posteriores, ataxia y aborto (Walsh *et al.*, 2000).

16. Conclusiones

Considerando la importancia económica de la neosporosis, es necesario desarrollar una medida de control biológico para prevenir su transmisión, infección y reducir la severidad de la enfermedad, ya que se encuentra difundida en los principales hatos lecheros mexicanos; por lo tanto, para prevenir esta enfermedad parasitaria se deben hacer recomendaciones a los trabajadores de las granjas y a los dueños de perros para disminuir el potencial de transmisión a los animales hospederos. La transmisión se da principalmente por la contaminación fecal del agua y alimentos y por la ingestión de fetos abortados, por becerros muertos y las membranas fetales de vacas infectadas por *N. caninum* por los hospederos definitivos, lo que puede conducir a la eliminación de ooquistes, fuente de infección horizontal para el ganado.

El control de la infección debe enfocarse a reducir el número de vacas infectadas en el hato y a limitar la introducción de ganado de reemplazo infectado al mismo hato, además de tomar medidas de control que se enfoquen a programas para reducir el número de animales infectados congénitamente en el hato y para minimizar la oportunidad de transmisión trasplacental del medio ambiente.

De acuerdo a la información disponible no es probable que *N. caninum* se transmita en forma venérea o por transferencia de embriones en el ganado, por lo que ésta práctica debe recomendarse como el método de control para prevenir la transmisión vertical. No obstante, hay que considerar que la transferencia de embriones no es una práctica de uso común en México y que su costo es elevado y representa por lo tanto una opción sólo para quienes tienen los recursos para emplearla.

Hasta ahora, no hay medicamentos ni vacunas probadas para eliminar o destruir los quistes tisulares de *N. caninum*, aunque, las sulfonamidas, piretaminas y clindamicinas son fármacos que pueden ser utilizados para su tratamiento.

17. Glosario

Anticuerpos monoclonales: son derivados de hibridomas son puros y específicos, se usan reactivos químicos estandarizados, y se obtienen en cantidades casi ilimitadas. En consecuencia, los anticuerpos monoclonales a menudo sustituyen a los antisueros convencionales en las pruebas inmunodiagnósticas.

Citocinas: proteínas sintetizadas por muchos tipos de células distintas que intervienen en las reacciones inflamatorias e inmunitarias. Las citocinas son los principales mediadores de la comunicación entre las células del sistema inmunitario.

Congénito: Presente y que existe desde el momento del nacimiento.

Coadyuvante. Sustancia que, cuando se administra junto con un antígeno, se intensifica la respuesta inmunitaria normal. Para que las vacunas con microorganismos inactivados sean eficaces, casi siempre es necesario intensificar la reacción inmunitaria con la administración de un coadyuvante con el antígeno. Son esenciales para establecer memoria duradera de los antígenos en sitios donde permanecen accesibles a los linfocitos reactivos e inducen a las células presentadoras de antígenos para expresar moléculas coestimuladoras como la CD80.

Decoquinato: (Decoquinato) quinolona anticoccidial no tóxica pero susceptible de crear un alto grado de desarrollo de coccidios resistentes

Encefalitis protozoaria multifocal necrótica no supurativa:

Encefalomiелitis: inflamación tanto del cerebro (encefalitis) como de la médula espinal

Endémico: presente en una comunidad en todo momento de baja morbilidad que está presente constantemente pero solo aparece clínicamente en pocos animales.

Endogenia: multiplicación asexual de los protozoos en la que las dos células hijas se forman dentro de la célula progenitora.

Epidemia: enfermedad de elevada morbilidad que se presenta solo ocasionalmente en la comunidad.

Epidémico: Que afecta a muchos sujetos de una región al mismo tiempo; de amplia difusión y rápida diseminación

Espástica: Caracterizado por espasmos o contracciones musculares que provocan rigidez, movimientos dificultosos y en algunos casos, andar a modo de tijera

Esporádico: que se presenta de forma aislada, al azar, ampliamente disperso; que no es epidémico ni endémico.

Exoftalmia: protusión anormal del ojo.

Fosfolípidos: Cualquier lípido que contenga fósforo, incluyen aquellos con una estructura de glicerol (fosfoglicéridos y pasmalógenos) o una estructura de esfingosina o de una sustancia parecida (esfingomielina). Son los principales lípidos de las membranas celulares

Hidrocefalea: Es una acumulación de líquido cefalorraquídeo en los ventrículos del cerebro que lleva a su aumento de tamaño e inflamación.

Inmunodominancia: propiedad de un determinante antigénico que le hace ser responsable de la principal respuesta inmune en un huésped.

Inmunoestimulante: sustancia que estimula una respuesta inmune.

Inmunohistoquímica: que indica la aplicación de interacciones antígeno anticuerpo en técnicas inmunohistoquímicas, como en el uso de fluoresceína.

Inmunomodulador: agentes que alteran la respuesta inmune mediante la supresión o realzamiento.

Interferón gamma: Es una linfocina producida por prolinfocitos T. Actúa como regulador del crecimiento de las células y tiene una variedad de efectos. P. ej., puede activar a los macrófagos, y, de este modo aumentar la fagocitosis.

ISCOMS (immune stimulating complexes): La corteza del árbol sudamericano Quillaja saponaria contiene una mezcla compleja de saponinas (glucósidos de tripteno), la cual posee actividad tanto tóxica como de coadyuvante. Mediante un fraccionamiento apropiado, es posible aislar saponinas que tengan una potente actividad coadyuvante y que carezca de toxicidad relevante. Tal saponina purificada se utiliza como coadyuvante en una vacuna recombinante contra la leucemia de los felinos. Puede construirse micelios utilizando antígenos proteínicos y una matriz de una mezcla de saponinas denominada Quil A. Estos complejos inmunoestimuladores (immune stimulating complexes, ISCOMS) son coadyuvantes eficaces, y en ellos se han observado pocos efectos secundarios. Las mezclas de saponinas tóxicas se utilizan en las vacunas contra el carbunco, en las cuales destruyen el tejido en el sitio de la inyección, principalmente para que las esporas del carbunco puedan germinar. Esta saponina también se emplea como coadyuvante en las vacunas contra la glosopeda, en la cual parece estimular la actividad de los linfocitos T. por desgracia, la saponina es muy destructiva. Se puede sustituir por el dextrán de dietilaminoetanol (DEAE).

PCR estándar, semicuantitativa, alojado solo en tubo, o seguido de una hibridación

Plausibilidad: eficiencia

Protusión: evaginación

Saponinas: Grupo de glucósidos en un potente surfactante de agentes hemolíticos que consisten de azúcar y sapogenina.

18. Referencias

- Ahn, H. J., S. Kim, D. Y. Kim y H. W. Nam. (2003) **ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera.** Korean J Parasitol;41(3):175-177.
- Anderson, M. L., A. G. Andrianarivo y P. A. Conrad. (2000) **Neosporosis in cattle.** Anim Reprod Sci;60-61:417-431.
- Andrianarivo, A. G. et al. (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.** Int J Parasitol;30(9):985-990.
- Antony, A. (2001) **Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle.** New Zealand Veterinary J;49(2):42 - 47.
- Atkinson, R. A. et al. (2000) **Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd.** Aust Vet J;78(4):262-266.
- Bae, J. S. et al. (2000) **Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea.** Korean J Parasitol;38(4):245-249.
- Barr, B. C., M. L. Anderson, J. P. Dubey y P. A. Conrad. (1991) ***Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions.** Vet Pathol;28(2):110-116.
- Baszler, T. V., S. Adams, J. Vander-Schalie, B. A. Mathison y M. Kostovic. (2001) **Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle.** J Clin Microbiol;39(11):3851-3857.
- Baszler, T. V., L. J. Gay, M. T. Long y B. A. Mathison. (1999) **Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions.** J Clin Microbiol;37(12):4059-4064.
- Baszler, T. V. et al. (1996) **Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay.** J Clin Microbiol;34(6):1423-1428.
- Bjorkman, C., S. Alenius, U. Manuelsson y A. Ugglå. (2000) ***Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion.** Vet J;159(2):201-206.
- Bjorkman, C., O. J. Holmdahl y A. Ugglå. (1997) **An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle.** Vet Parasitol;68(3):251-260.
- Bjorkman, C. et al. (1999) **An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection.** J Vet Diagn Invest;11(1):41-44.
- Calzada, C. P. et al. (2002) **Hematological values in Holstein- Friesian *Neospora caninum* seropositive cows from the dairy cattle region of Tizayuca in the State of Hidalgo in Mexico.** Vet Méx;33(2):119-124.
- Canon, F. W. A. et al. (2003) **Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Amazon, Brazil.** Vet Parasitol;115(1):71-74.

- Collantes, F. E., A. Zaballos, G. Alvarez-Garcia y L. M. Ortega-Mora. (2002) **Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR.** J Clin Microbiol;40(4):1194-1198.
- De Marez, T., S. Liddell, J. P. Dubey, M. C. Jenkins y L. Gasbarre. (1999) **Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses.** Int J Parasitol;29(10):1647-1657.
- Dijkstra, T., H. W. Barkema, M. Eysker y W. Wouda. (2001a) **Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds.** Int J Parasitol;31(2):209-215.
- Dijkstra, T. et al. (2001b) **Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites.** Int J Parasitol;31(8):747-752.
- Dubey, J. P. (1999a) **Neosporosis--the first decade of research.** Int J Parasitol;29(10):1485-1488.
- Dubey, J. P. (1999b) **Recent advances in *Neospora* and neosporosis.** Vet Parasitol;84(3-4):349-367.
- Dubey, J. P. (2003a) **Neosporosis in Cattle.** J Parasitol;89:42 - 56.
- Dubey, J. P. (2003b) **Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals.** Korean J Parasitol;41(1):1-16.
- Dubey, J. P. et al. (1998a) **Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture.** Int J Parasitol;28(8):1293-1304.
- Dubey, J. P. et al. (1999a) **High prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*).** Int J Parasitol;29(10):1709-1711.
- Dubey, J. P. et al. (1997) **Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays.** J Parasitol;83(6):1063-1069.
- Dubey, J. P. y D. S. Lindsay. (1989) **Transplacental *Neospora caninum* infection in cats.** J Parasitol;75(5):765-771.
- Dubey, J. P. et al. (2002) **Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Sarcocystis neurona* in sera of domestic cats from Brazil.** J Parasitol;88(6):1251-1252.
- Dubey, J. P., S. Romand, M. Hilali, O. C. Kwok y P. Thulliez. (1998b) **Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt.** Int J Parasitol;28(3):527-529.
- Dubey, J. P., M. C. Venturini, L. Venturini, J. McKinney y M. Pecoraro. (1999b) **Prevalence of antibodies to *Sarcocystis neurona*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in horses from Argentina.** Vet Parasitol;86(1):59-62.
- Ellis, J. T. et al. (1999) **The genus *Hammondia* is paraphyletic.** Parasitology;118 (Pt 4):357-362.

- French, N. P., D. Clancy, H. C. Davison y A. J. Trees. (1999) **Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control.** Int J Parasitol;29(10):1691-1704.
- Fujii, T. U., N. Kasai, S. M. Nishi, J. P. Dubey y S. M. Gennari. (2001) **Seroprevalence of *Neospora caninum* in female water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from the southeastern region of Brazil.** Vet Parasitol;99(4):331-334.
- Gennari, S. M. et al. (2002) **Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil.** Vet Parasitol;106(2):177-179.
- Gondim, L. F., L. Gao y M. M. McAllister. (2002) **Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts.** J Parasitol;88(6):1159-1163.
- Gondim, L. F., M. M. McAllister, W. C. Pitt y D. E. Zemlicka. (2004) **Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*.** Int J Parasitol;34(2):159-161.
- Guarino, A., G. Fusco, G. Savini, G. Di Francesco y G. Cringoli. (2000) **Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Southern Italy.** Vet Parasitol;91(1-2):15-21.
- Howe, D. K. et al. (2002) **Sensitive and specific identification of *Neospora caninum* infection of cattle based on detection of serum antibodies to recombinant Ncp29.** Clin Diagn Lab Immunol;9(3):611-615.
- Jenkins, M., T. Baszler, C. Bjorkman, G. Schares y D. Williams. (2002) **Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion.** Int J Parasitol;32(5):631-636.
- Jenkins, M., C. Parker, W. Tuo, B. Vinyard y J. P. Dubey. (2004) **Inclusion of CpG adjuvant with plasmid DNA coding for NcGRA7 improves protection against congenital neosporosis.** Infect Immun;72(3):1817-1819.
- Jenkins, M. C., W. Wouda y J. P. Dubey. (1997) **Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion.** Clin Diagn Lab Immunol;4(3):270-274.
- Kashiwazaki, Y., R. E. Giannechini, M. Lust y J. Gil. (2004) **Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay.** Vet Parasitol;120(1-2):139-144.
- Kim, J. H., J. K. Lee, E. K. Hwang y D. Y. Kim. (2002a) **Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Korean native beef cattle.** J Vet Med Sci;64(10):941-943.
- Kim, J. H. et al. (2002b) **Diagnostic survey of bovine abortion in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*.** J Vet Med Sci;64(12):1123-1127.
- Kobayashi, A., S. Katagiri, T. Kimura, K. Ochiai y T. Umemura. (2002) **Steroid hormones do not reactivate *Neospora caninum* in ovariectomized mice.** J Vet Med Sci;64(9):773-777.
- Lally, N. C., M. C. Jenkins y J. P. Dubey. (1996) **Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis.** Clin Diagn Lab Immunol;3(3):275-279.

- Lindsay, D. S., J. P. Dubey y R. B. Duncan. (1999) **Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum***. *Vet Parasitol*;82(4):327-333.
- Maley, S. W., D. Buxton, K. M. Thomson, C. E. Schriefer y E. A. Innes. (2001) **Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study**. *Vet Parasitol*;96(1):1-9.
- McAllister, M. M., C. Bjorkman, R. Anderson-Sprecher y D. G. Rogers. (2000) **Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows**. *J Am Vet Med Assoc*;217(6):881-887.
- McAllister, M. M. et al. (1998) **Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum***. *Int J Parasitol*;28(9):1473-1478.
- Nam, H. W., S. W. Kang y W. Y. Choi. (1998) **Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens**. *Korean J Parasitol*;36(4):269-275.
- Nishikawa, Y., F. G. Claveria, K. Fujisaki y H. Nagasawa. (2002a) **Studies on serological cross-reaction of *Neospora caninum* with *Toxoplasma gondii* and *Hammondia heydorni***. *J Vet Med Sci*;64(2):161-164.
- Nishikawa, Y. et al. (2001) **Comparison of the growth inhibitory effects of canine IFN-alpha, -beta and -gamma on canine cells infected with *Neospora caninum* tachyzoites**. *J Vet Med Sci*;63(4):445-448.
- Nishikawa, Y., T. Mikami y H. Nagasawa. (2002b) **Vaccine development against *Neospora caninum* infection**. *J Vet Med Sci*;64(1):1-5.
- Packham, A. E. et al. (1998) **A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay**. *Clin Diagn Lab Immunol*;5(4):467-473.
- Park, C. H. et al. (2000) ***Neospora caninum* infected the alimentary tract of nude mice and was transmitted to other mice by intraperitoneal inoculation with the intestinal contents**. *J Vet Med Sci*;62(5):525-527.
- Petersen, E. et al. (1999) ***Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans**. *Emerg Infect Dis*;5(2):278-280.
- Reichel, M. P. (2000) ***Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand**. *Aust Vet J*;78(4):258-261.
- Sager, H. et al. (2001) **A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology**. *Vet Parasitol*;102(1-2):1-15.
- Sánchez, S. G. F., E. Morales, J. M. J. Martínez y F. Trigo. (2003) **Determination and correlation of anti- *Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico Short communication**. *The Canadian Journal of Veterinary Research*;67:142-145.
- Schares, G. et al. (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(2):109-119.
- Schares, G. et al. (2000) **Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis**. *Int J Parasitol*;30(10):1123-1130.

- Schares, G., U. Wenzel, T. Muller y F. J. Conraths. (2001) **Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*)**. Int J Parasitol;31(4):418-423.
- Slapeta, J. R. et al. (2002) **Coprodagnosis of Hammondia heydorni in dogs by PCR based amplification of ITS 1 rRNA: differentiation from morphologically indistinguishable oocysts of *Neospora caninum***. Vet J;163(2):147-154.
- Son, E. S., H. J. Ahn, J. H. Kim, D. Y. Kim y H. W. Nam. (2001) **Determination of antigenic domain in GST fused major surface protein (Nc-p43) of *Neospora caninum***. Korean J Parasitol;39(3):241-246.
- Stenlund, S., H. Kindahl, U. Magnusson, A. Ugglå y C. Bjorkman. (1999) **Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum***. Vet Parasitol;85(4):227-234.
- Stoessel, Z., L. Taylor, M. McGowan, G. Coleman y L. JK. (2003) **Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* within central Queensland beef cattle**. Aust Vet J;81:165-166.
- Tomioka, Y., M. Sawada, K. Ochiai y T. Umemura. (2003) ***Neospora caninum* antigens recognized by mouse IgG at different stages of infection including recrudescence**. J Vet Med Sci;65(6):745-747.
- Toolan, D. (2003) ***Neospora caninum* abortion in cattle - a clinical perspective**. Irish Veterinary J;56(8):404 - 410.
- Tranas, J., R. A. Heinzen, L. M. Weiss y M. M. McAllister. (1999) **Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum***. Clin Diagn Lab Immunol;6(5):765-767.
- Uchida, Y., K. Ike, T. Kurotaki, M. Takeshi y S. Imai. (2003) **Susceptibility of Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*) to *Neospora caninum* infection**. J Vet Med Sci;65(3):401-403.
- Walsh, C. P., R. B. Duncan, A. M. Zajac, B. L. Blagburn y D. S. Lindsay. (2000) ***Neospora hughesi*: experimental infections in mice, gerbils, and dogs**. Vet Parasitol;92(2):119-128.
- Wouda, W., J. Brinkhof, C. van Maanen, A. L. de Gee y A. R. Moen. (1998) **Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds: A comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays**. Clin Diagn Lab Immunol;5(5):711-716.