

FECHA DE ADQUISICIÓN	
NUM. DE INVENTARIO	00075
PROCEDENCIA	
NUM. CALIFICACIÓN	
PRECIO	
DIST.	

	SF967
00075	.N46
	2006
	TESIS
	Ej.1

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“Detección de anticuerpos de *Neospora caninum* en
bovinos Holstein de la región menonita del Estado de
Chihuahua, por medio de la prueba de ELISA”**

POR

JOSÉ ALFREDO SÁENZ ESPINO

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA. MÉXICO

FEBRERO DEL 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

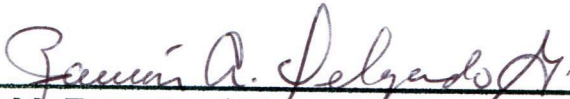
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“Detección de anticuerpos de *Neospora caninum* en
bovinos Holstein de la región menonita del Estado de
Chihuahua, por medio de la prueba de ELISA”**

TESIS

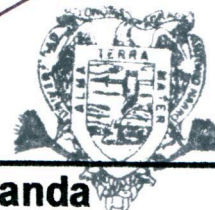
APROBADA POR EL COMITÉ DE TESIS

PRESIDENTE DEL JURADO


M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE
CIENCIA ANIMAL


M.C. Ernesto Martínez Aranda



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

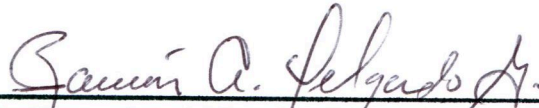
00075

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

**“Detección de anticuerpos de *Neospora caninum* en
bovinos Holstein de la región menonita del Estado de
Chihuahua, por medio de la prueba de ELISA”**



**M.C.V. Ramón Alfredo Delgado González
PRESIDENTE**



**M.C. Ma. Guadalupe De La Fuente Salcido
VOCAL**



**I.Z. Jorge Horacio Borunda Ramos
VOCAL**



**M.C. Ernesto Martínez Aranda
VOCAL SUPLENTE**

INDICE DE CONTENIDO

	Página
Resumen	i
Agradecimientos	ii
Dedicatorias	iii
I. Introducción	1
II. Marco de Referencia	2
III. Antecedentes	3
a. Estructura de <i>Neospora caninum</i>	8
b. Ciclo Biológico	11
c. Patogenia e inmunología	12
d. Manifestaciones clínicas	16
e. Lesiones	18
f. Epidemiología	19
g. Métodos de Diagnóstico	20
IV. Justificación	22
V. Objetivos	22
VI. Material y Métodos	22
VII. Resultados	26
VIII. Discusión	27
IX. Literatura Citada	29

Resumen

Se tomaron 51 muestras de sangre de bovinos Holstein hembras, en forma aleatoria, en diferentes campos menonitas de la región de Cuauhtémoc, Chihuahua, a las cuales se les extrajo el suero y se congelaron para ser trasladados a la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, y se les realizó el estudio de ELISA obteniendo un 47% de sueros positivos, con una desviación estándar de 0.55. Este resultado nos indica que el parásito está presente. Debido a que en la región menonita del Estado de Chihuahua no se habían llevado a cabo estudios relacionados con la presencia de *Neospora caninum* y considerando que este protozoo produce grandes pérdidas económicas, se procedió a realizar este estudio para detectar anticuerpos de *Neospora caninum* y conocer la frecuencia del parásito en la región.

Dedicatoria

A mis padres Liborio Sáenz Olivas y
Maria Dolores Espino Pérez por haberme
dado la vida y enseñarme el camino correcto.

A mi esposa Maria de Lourdes Estrada Lucio y
a mi hijo Héctor Aarón Sáenz Estrada
por la alegría que han dado a mi vida, y
por ser una razón importante para seguir adelante.

A mis hermanos Maria del Refugio Sáenz Espino,
Juan Manuel Sáenz Espino y
Luis Alberto Sáenz Espino
por su apoyo durante mi carrera

Agradecimientos

A Dios por darme la oportunidad de concluir con mis estudios

A mis suegros Aurelia Lucio Sánchez y Carlos Estrada por ser apoyo que me han dado y orientarme a seguir adelante

Al M. C. V. Ramón Alfredo Delgado González Por su apoyo durante mi carrera y en la elaboración de este trabajo

A mi Universidad por haberme albergado durante mi carrera y darme la formación necesaria para triunfar en la vida

A mis sinodales M. C. Ma. Guadalupe De La Fuente Salcido, I. Z. Jorge Horacio Borunda Ramos, M. C. Ernesto Martínez Aranda por el tiempo dedicado en la revisión de este trabajo y darme ánimos para seguir adelante.

A todos mis compañeros con los que pase momentos muy importantes e inolvidables.

I. Introducción.

Neospora caninum es un parásito que se encontró por primera vez en Noruega en 1984, en caninos (Bjerkas, 1984), y la primera asociación de abortos causados por este parásito en bovinos, se determinó en Nuevo México, EUA por Dubey en el año de 1987, aunque estudios retrospectivos demostraron que el parásito ha sido endémico desde 1957 (Dubey, 1990). Se sabe que afecta a muchas especies como caninos, bovinos, caprinos, ovinos, equinos y ciervos, además este parásito es contagiado a muchas otras especies de animales incluyendo monos del viejo mundo (Dubey, 1999 b). Los perros son importantes en la epidemiología de este parásito porque son los únicos huéspedes definitivos conocidos que excretan oocistos de este parásito (Gennari, 2002). Se han hecho reportes de abortos causados por *N. caninum* en varios países de Europa, Asia, África, Australia y América. En México, se ha detectado la presencia de este protozoario por medio de la técnica de ELISA y lesiones en fetos, en Tizayuca, Hidalgo (Morales, 1997), en la Comarca Lagunera (Delgado, 1995) y Aguascalientes (García-Vázquez 2002). La importancia del diagnóstico en todas las cuencas lecheras del país permitirá llevar a cabo medidas preventivas y de control para evitar el aumento y la diseminación de la enfermedad. En la región menonita del Estado de Chihuahua, a la fecha no hay reportes de la enfermedad, es por esto que el presente trabajo tiene como objetivo demostrar la presencia del parásito en la utilizando la técnica de ELISA.

II. Marco de Referencia.

La región menonita del Estado de Chihuahua se encuentra en el noroeste del mismo, principalmente en el municipio de Cuauhtémoc, pero además, abarca una pequeña porción de los municipios de Riva Palacios y Namiquipa. Los primeros menonitas llegaron a la región a principios de 1922, procedentes de Canadá, su origen es ruso-germano, y se establecieron en terrenos que compraron al latifundista Zuluaga, ubicados en el municipio de Cuauhtémoc. Los menonitas constituyeron dos colonias llamadas "*Manítoaba*" y "*Swift Current*", subdivididas en campos, numerados desde el 1 hacia delante los de la primera, y del 101 los de la segunda. El municipio de Cuauhtémoc tiene una superficie de 3,018.90 km² lo que representa el 1.2% de la superficie estatal. Se localiza en la región central del estado entre las coordenadas 28° 24" de latitud norte y 106° 52" de longitud oeste, con una altitud de 2,060 metros sobre el nivel del mar. Limitada con los siguientes municipios: al norte con Namiquipa, al sur con Cusihiuriachi y Gran Morelos, al Este con Riva Palacios y al oeste con Bachiniva y Guerrero. El clima en el municipio se clasifica en transición, de semihumedo a templado; con una temperatura media anual de 14 °C y una mínima de -14.6 °C. La precipitación pluvial media anual es de 439 milímetros, con humedad relativa al 65% y un promedio anual de 66 días de lluvia. Los vientos dominantes provienen del suroeste (<http://www.presidenciacuauhtemoc.org/>).

El estado de Chihuahua cuenta con extensas áreas de pastizales (el 72 por ciento de la superficie territorial esta destinada a usos pecuarios) en su mayor proporción natural, lo cual condiciona que la ganadería sea una actividad relevante. En el Estado, el ganado bovino tiene supremacía y representa el 60 por ciento del inventario correspondiente. Su producción se orienta a la exportación de becerros en pie hacia los Estados Unidos. Los productos pecuarios de mayor relevancia son la leche con 207,193 cabezas de ganado, y una producción de leche de 802,000 toneladas, la carne de bovino con 837,414 cabezas de ganado, con una producción de 65,970 toneladas de carne y de cerdo con 158,568 cabezas, ocupando el Estado un lugar importante a nivel nacional (INEGI, 2002).

III. Antecedentes.

La historia de la *Neosporosis* se inicia en 1984 con un reporte de Bjerkas en Noruega de un caso de encefalitis y miocarditis en caninos, producido por un protozoario (Bjerkas, 1984).

Para 1988, en Estados Unidos de Norteamérica se aisló un parásito de características similares en 10 perros que sufrían alteraciones neurológicas, demostrándose, con el uso de técnicas serológicas e inmunohistoquímicas, que se trataba de un parásito diferente a *Toxoplasma gondii* y que fue denominado *Neospora caninum* (Dubey, 1988).

En 1989, Thilsted y Dubey, asociaron a *Neospora* con un brote de abortos en ganado vacuno de Nuevo México. Desde entonces, *Neospora* ha sido descrita en países de los cinco continentes. Se ha demostrado que *Neospora* infecta de forma natural otras especies animales como ovejas, cabras, búfalos de agua, caballos, ciervos, camellos, coyotes, zorros y dingos (Dubey, 1999).

Además Dubey y col., en 1989 describieron la diferencia entre *Sarcocystis* spp, *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*. A partir de 300 cortes histológicos de cuatro terneros paralizados que Parish y colaboradores en 1987 hicieron mención de una inusual mielitis. Al examinarlos descubrieron que estos eran diferentes a *T. gondii* y *Sarcocystis* pero muy similares a *N. caninum* (Dubey y col., 1989 a).

Dubey y Lindsay (1989) inocularon por vía subcutánea y oral a tres gatitos sin inocular a la madre y un gatito, encontrando lesiones importantes en el hígado (ictericia, hepatomegalia, necrosis centrilobulillar), otras lesiones como neumonía y encefalitis. Tampoco se encontraron anticuerpos contra *T. gondii* en pruebas de aglutinación. Esta observación indicó que el rango de hospedadores no se

limitaba solo al perro y que podía producir lesiones en otras especies (Dubey y Lindsay, 1989 b).

Barr estudió 445 fetos de bovino de 54 hatos lecheros y dos hatos de carne a una evaluación en el Sistema de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario de California en un periodo de dos años (1987-1989), y de estos, 82 tuvieron encefalitis, miocarditis, o estructuras de protozoarios. Los protozoarios fueron encontrados en el parénquima cerebral, en células endoteliales, en las fibras miocárdicas y fueron asociadas con células endoteliales también. Los fetos analizados fueron de 3 a 9 meses de gestación, pero la mayoría eran de 5 a 7 meses de gestación. (Barr, 1990).

Dubey (1990) describió los signos encontrados en un feto de 8 meses abortado de una vaca Shorthorn de 2 años de edad. Las lesiones fueron encontradas en el corazón, hígado y cerebro, estudios como cultivo bacteriano dieron negativos, no se encontró virus no citopatogénico de la Diarrea Viral Bovina (DVB), los niveles de cobre estaban normales, el selenio poco bajo, y el nitrato estaba excedido de lo normal. Este fue el primer reporte de de *N. caninum* en el miocardio de bovino (Dubey, 1990).

En 1991, Barr publicó un estudio realizado en 80 fetos de bovinos con una infección sugestiva a protozoarios en un estudio de dos años anteriores, el estudio fue examinado por histología (H:E), por inmunohistoquímica utilizando antisuero contra *Neospora caninum*. 20 fetos fueron examinados con inmunohistoquímica con antisuero de *N. caninum*, *Hammondia hammondi* y *Toxoplasma gondii*. *N. caninum* se diagnosticó mas veces que *Sarcocystis spp*, *Hammondia hammondi* y *Toxoplasma gondii* (Barr, 1991 a).

Barr describió los signos clínicos de *Neospora caninum* encontrados en becerros de 3 días de nacidos, en los que encontró los signos de enfermedad en los miembros anteriores, además de signos en esófago y abomaso. También se vio afectada la columna vertebral (Barr, 1991 b).

Ogino y col. (1992) observaron en cuatros casos de fetos abortados de 5 meses de gestación y un becerro recién nacido, necrosis multifocal y taquizoitos, pero no células inflamatorias, además las células del sistema nervioso central fueron destruidas por la multiplicación de taquizoitos. Sin embargo un feto de 7 meses de edad y el ternero tuvieron una respuesta inmunitaria con muchas células conteniendo IgG y quistes en los tejidos. Esta aparente asociación entre edad de gestación y el grado de tejido inflamatorio tiene como reflejo el desarrollo progresivo del sistema inmune en los fetos bovinos (Ogino, 1992).

Dubey, en septiembre de 1992 realizó un experimento en tres vacas multiparas de la raza Jersey, a las cuales inoculó con taquizoitos de *N. caninum*. Los fetos presentaron lesiones características de la enfermedad, además se inocularon muestras homogenizadas en ratones y medios de cultivo celular. Se encontraron taquizoitos en los cultivos y en frotis de pulmón de ratón. No se encontró crecimiento de taquizoitos en cultivos celulares ni en ratones a partir de encéfalo de una vaca, no se observaron lesiones en ésta (Dubey, 1992).

Dubey (1992) describió una becerria Hereford de cuatro semanas de edad, estaba clínicamente normal al nacimiento, a las 2 semanas de edad estaba débil y fue decaendo hasta estar paralizada y fue sacrificada. En el estudio histopatológico presentó los signos característicos de *N. caninum*. En la discusión se sugirió que ésta se infectó en la fase final de la gestación o inmediatamente después del nacimiento (Dubey, 1992).

Conrad realizó el primer aislamiento y caracterización de *Neospora*. La aisló a partir del cerebro de dos fetos de bovino. Estos fetos presentaron lesiones de *N. caninum* que fue confirmada por medio de inmunohistoquímica. Obtuvo el primer cultivo aislado a los 34 días después de la inoculación en células de la línea 87-3. El segundo aislamiento *in vitro* fue aparente cuando los taquizoitos fueron primero observados en el cultivo de células 87-3, 14 días después de la inoculación con tejido cerebral. Los taquizoitos fueron vistos moviéndose en los cultivos y en frotis teñidos con Giemsa (Conrad, 1993).

de la raza Santa Gertrudis en Columbia Británica. En él encontró las lesiones en cerebro, corazón e hígado, además fue confirmada la infección por la técnica de inmunohistoquímica (Mc Intosh, 1994).

Anderson (1995) realizó un estudio para determinar el rango de abortos ocasionados por *Neospora caninum* en 26 establos de vacas lecheras del estado de California. Todos los fetos abortados fueron sometidos a las pruebas en el Laboratorio de Diagnóstico del Estado. Los fetos con lesiones histológicas sugestivas a protozoarios fueron examinados por inmunohistoquímica. Se determinó que la infección de *Neospora spp* fue la mayor causa de abortos. La mayoría fueron de hatos con historia de abortos, y fue identificado como el agente causante en 43.5% de los abortos de estos hatos. Los fetos fueron abortados a la mitad de la gestación con un promedio de 5.5 meses. También observó que vacas habían repetido aborto debido a una infección con *N. caninum* ya sea por persistencia de la infección o reinfección de la madre. La inmunidad adquirida en algunos casos es insuficiente para prevenir la infección fetal durante el embarazo o durante el nacimiento (Anderson, 1995).

Barber, en 1995, hizo el primer aislamiento y caracterización de *Neospora caninum* en Europa, a partir de tejidos de un perro Boxer de 4 semanas de edad que presentó signos de neosporosis y se confirmó por inmunofluorescencia indirecta. Después de tratamiento sin mejoría se hizo la eutanasia y se confirmó la infección por medio de inmunohistoquímica. Realizó una mezcla homogénea de cerebro y la cultivo en células Vero usando un medio RPMI-1640. Hizo un frotis del cultivo y lo tiñó con Giemsa, además lo comprobó por medio de inmunofluorescencia indirecta. La ultraestructura fue similar a NC-1 (Nombre de la primer *Neospora* aislada). También estudio el rRNA y los resultados los depositó en el banco de genes con el número U 16159 la secuencia fue homologa a la de NC -1 (Barber, 1995).

En la Comarca Lagunera, México, Delgado y col., en 1995, encontraron que de un 73 a un 77 % de fetos bovinos abortados, analizados por histopatología, tenían la presencia de lesiones necróticas en encéfalo y no

supurativas en corazón y músculo, reportando los casos como sugestivos a lesiones por protozoarios compatibles con *Neospora caninum* (Delgado y col., 1995).

En 1996 Dubey describió el primer caso de aborto en cabras de la raza Sanne. El cual fue remitido al Departamento de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma Nacional de Costa Rica. El feto fue abortado a los 3.5 meses de gestación y la madre ya tenía incidencia de abortos en años previos. Además cabras de estos hatos tuvieron cabritos con parálisis y fueron sacrificados. Se practicó la necropsia y se observó por medio de tinciones con HE, se encontraron lesiones características de *N. caninum*, taquizoitos y quistes del protozooario, además las pruebas de inmunohistoquímica confirmaron la infección de *Neospora caninum* (Dubey, 1996).

Morales y col., en 1997, realizó el primer aislamiento y caracterización de *Neospora caninum* en México. La aisló a partir del cerebro de un feto de bovino de 5 meses de gestación. Este feto presentó lesiones de *N. caninum* con focos de necrosis y gliosis en encéfalo, además de un quiste parasitario oval de pared gruesa, que fue confirmado por medio de inmunohistoquímica, encontrando también grupos de taquizoitos extracelulares asociados a las áreas de gliosis (Morales y col., 1997).

En un caballo de 20 años de edad fue encontrado mieloencefalitis producida por protozoarios con severa ataxia, el fluido cerebroespinal fue positivo a *Sarcocystis neurona*, pero pruebas de inmunohistoquímica, microscopia de luz y electrónica revelaron que el protozooario fue *Neospora caninum* y no *Sarcocystis neurona* (Hamir, y col., 1998).

En Italia fue encontrado un perro de 5 años de edad con una lesión cutánea asociada con *Neospora caninum*. Histológicamente reveló un gran número de taquizoitos y el diagnóstico se confirmó por inmunohistoquímica y microscopía electrónica y de luz. La lesión se resolvió después de 21 días de tratamiento con **Clindamicina hidrociorada** (Poli, 1998).

En España nororiental fue realizado un estudio para determinar por medio de exámenes coproparasitológicos y por medio de PCR la presencia de *Neospora caninum* en zorros rojos de estas regiones. La detección de etapas *N. caninum* en cerebro de zorros rojos naturalmente infectados demostró que los zorros rojos son un anfitrión intermediario natural para *N. caninum*. En las muestras fecales no se encontró ningún oocisto compatibles con *N. caninum*. En este estudio se encontró una infección latente en zorros rojos de España nororiental lo cual indica que los zorros rojos podrían tener un papel muy importante en la epidemiología de la neosporosis en esta área (Almería, 2002).

En Portugal se aisló *Neospora caninum* de un feto abortado de 4 meses de edad de un hato lechero con neosporosis endémica, el método por el cual se aisló fue por medio de inoculación de una mezcla homogenizada de cerebro en el peritoneo de un ratón, después el exudado peritoneal de estos ratones fueron inoculados con células de sarcomera de ratón en la cavidad abdominal de ratones. Fueron encontrados taquizoitos en el exudado de los ratones del segundo paso. Estos taquizoitos dieron resultados positivos a los anticuerpos Anti-*N. caninum* y no al los de Anti-*T. gondii*, además se obtuvo el DNA específico de *Neospora caninum* (Canada y col., 2002).

1. Estructura de *Neospora caninum*

Parish y col. en 1987 reportaron unas estructuras quísticas de 20 x 30 μm que contenían organismos de 1 x 2 μm , en la sección de la médula espinal de cuatro fetos de bovinos, de los cuales no se definió la etiología pero el organismo fue considerado que era similar a *Toxoplasma gondii* y a *Sarcosystis spp.*

Para 1988, en Estados Unidos de Norteamérica se aisló un parásito de características similares en 10 perros que sufrían alteraciones neurológicas, demostrándose, con el uso de técnicas serológicas e inmunohistoquímicas, que se trataba de un parásito diferente a *Toxoplasma gondii* y que fue denominado *Neospora caninum* (NC-1) (Dubey, 1988).

Para 1989, por su parte Dubey y col., reexaminaron los cortes histológicos de los cuatro fetos, analizados por Parish y col. en 1987, y encontraron un protozoo estructuralmente distinto a *T. gondii* y a *Sarcocystis spp* pero similar a *N. Caninum*. Los quistes observados en el tejido cerebral, eran de 2.5 μm de tamaño y encerraban **bradizoitos** de aproximadamente 1.0 por 1.5 de ancho y de 6 a 7 μm de largo. Otros organismos fueron vistos, de 27 a 62 μm por 25 a 42 μm . También se observaron grupos de **taquizoitos** de 10 a 16 μm por 9 a 15 μm y los **taquizoitos** individuales midieron de 1.5 por 4.0 μm . Estos organismos se diferenciaron de *T. gondii* por la estructura del quiste. El quiste de *N. caninum* esta lleno de **bradizoitos**, mientras que el quiste de *T. gondii* siempre esta con pocos **bradizoitos**. También se pudo distinguir de *Sarcocystis spp* porque *Neospora caninum* se divide por endodiogenia, y los **merozoitos** están en las células de la neuroglia, y el tejido quístico es aseptal, mientras que los **esquizontes** de *Sarcocystis spp* se dividen por endopoliogenia (división nuclear múltiple, después división citoplasmática), los **esquizontes** se encuentran en los vasos sanguíneos, y *Sarcocystis spp* es usualmente septal (Dubey, 1989).

Barr describió unas estructuras redondas u ovoides en los cerebros de fetos, de 1.5 a 2 por 2 a 6 μm con prominentes núcleos, y en mas casos, un plasmalema distinto. Los parásitos están frecuentemente en forma de racimo rodeados por una membrana o pared limitante. Este parásito fue referido como **zoito**, Porque una distinción entre **merozoitos** de **esquizontes** o **taquizoitos** y **bradizoitos** dentro del quiste, no pueden de hecho distinguirse por microscopía de luz (Barr, 1990).

Grupos de **taquizoitos** e individuales son vistos en corazón, en grupo llegan a medir de 30 μm de ancho por 100 μm de largo, y los **taquizoitos** individuales miden de 2.0 por 5.0 μm . En encéfalo los quistes se observan de 20 μm de diámetro y contienen numerosos **bradizoitos** encerrados por una pared gruesa y muy evidente de 1.0 μm de grosor (Dubey, 1990).

Barr observó por microscopía electrónica en secciones de cerebro, los quistes del protozoo que median 13.0 μm por 15.4 μm (en rangos de 6.8 a 22.7 por 7.4 a 23.7 μm), el grosor de la pared del quiste en promedio fue de 0.86 μm

(con variantes de 0.34 a 1.05, 0.23 a 0.77, 0.43 a 1.05 y 0.77 a 1.22 μm) y contenían gránulos de diferentes tamaños, además de invaginaciones tabulares visibles en toda la periferia de algunas partes de la pared del quiste. Se observaron estructuras vesiculares y tabulares en las sustancias establecidas dentro del quiste del protozooario (Barr, 1991 a).

El quiste en tejido es encontrado con un diámetro de 20 a 48 μm (otros de 14 a 20 μm) de diámetro con una pared quística de 1 a 2 μm de grosor localizados en el citoplasma de las neuronas. El quiste contiene largos y delgados **bradizoitos** de tamaño de 6.9 por 1.5 μm (con rango de 5 a 8 por 1 a 2 μm) los **bradizoitos** contienen gránulos PAS (Tinción de Ácido Periódico de Shift) positivos. Comparado con quistes de *T. gondii* de cerebro de ratón donde los quistes tienen un rango de 14 a 49 μm de diámetro con una pared quística de menos de 1.0 μm de grosor. Los **bradizoitos** están encerrados y ajustados en el quiste y no pueden ser medidos por microscopía de luz. Por medio de microscopía electrónica, los quistes vistos en el citoplasma de las neuronas, tienen una pared media de 0.53 a 3.09 μm de grosor. La pared del quiste tiene una membrana compleja exterior y gruesas capas de membranas limitantes interiores con vesículas y gránulos en el exterior y pequeños gránulos densos en todo el interior. La membrana compleja exterior consiste de una única membrana completa con 1 o 2 membranas incompletas exteriores que se continúan con retículo endoplásmico del citoplasma de la neurona. La primer parte tiene invaginaciones tubulares que se extienden dentro la capa vesiculogranular ancha. Estas invaginaciones tubulares son similares en diámetro y apariencia a las vesículas de membrana limitante en la pared vesiculogranular única del quiste (20 a 40 nm de diámetro) (Barr, 1991 b).

El primer parásito aislado (NC-1) tenía un rango de 8 a 10 μm de diámetro con un a pared de 1.0 μm de grosor y encerraba de 25 a 40 **bradizoitos**. Los quistes del segundo aislamiento (NC-Liy) media de 8 a 13 μm de diámetro con 25 a 50 **bradizoitos** encerrados, y los quistes tenían una pared de 1 a 2 μm de grosor. En tinciones de Giemsa los **taquizoitos** extracelulares median de 1.5 a 2.5 μm de ancho por 6 a 8 μm de largo (Conrad.1993).

A partir de la descripción y caracterización diferente de *Neospora caninum* con otros protozoarios, se clasifica en el **phylum** apicomplexa, familia *sarcocystidae*, a la que también pertenecen los géneros toxoplasma, Sarcocystis y hammondia (Cebrián y col., 2000; Rojas, 2003).

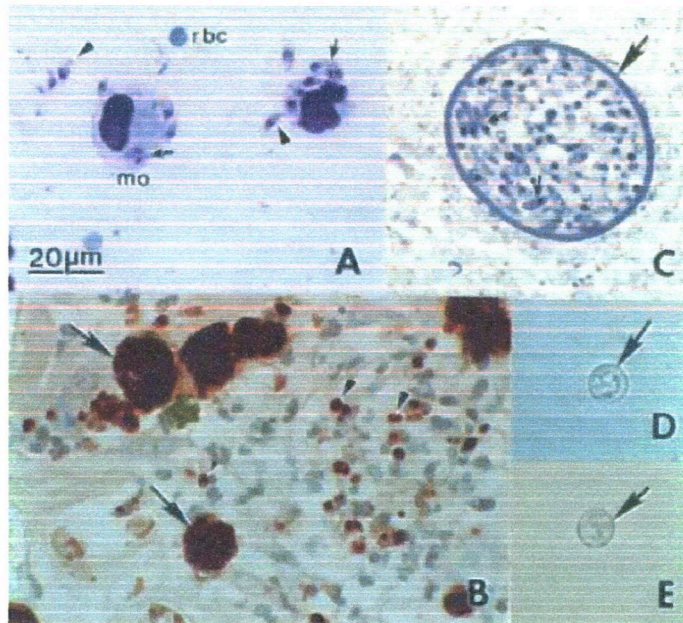


Figura 1. Estructura de *Neospora caninum*. (A) Taquizoitos en un frotis de pulmón (Tinción de Giemsa). Se notan los organismos individuales y dividiendo se en 2 (flechas), compare el tamaño con la célula roja (rbc) y un macrófago (mo). (B) Taquizoitos en grupos e individuales (flechas) en secciones de piel teñidas con inmunohistoquímica con anticuerpos anti - *N. caninum*. (C) Quiste en tejido en sección de encéfalo. Note el grosor de la pared del quiste eclosionando bradizoitos (flechas). Tinción de azul de toudina. (D) Oocistos no esporulados con un esporonte individual (flecha). (E) Oocisto esporulado (flecha). No teñida (Dubey, 2003)

2. Ciclo Biológico.

Los perros son hospedadores intermediarios y definitivos de *Neospora caninum* (Mc Allister y col., 1998). El ciclo de vida se caracteriza por tres estadios infecciosos, taquizoitos, quistes titulares y oocistos (Figuras 1 y 2). Los taquizoitos y los quistes titulares son estadios que se encuentran intracelularmente en los hospedadores intermedios (Dubey, 2003). Los taquizoitos se encuentran en diversos tejidos como pulmón músculo, corazón e hígado y los quistes en tejido nervioso, además estos encierran a los bradizoitos. Peters y col. reportan quistes

en músculo de perros y bovinos naturalmente infectados (Peters y col., 2001). Los perros domésticos son los únicos hospedadores definitivos de *Neospora caninum*, presentan oocistos no esporulados en intestino los cuales esporulan fuera de el (Lindsay y col., 1999).

ciclo de vida de *Neospora caninum*

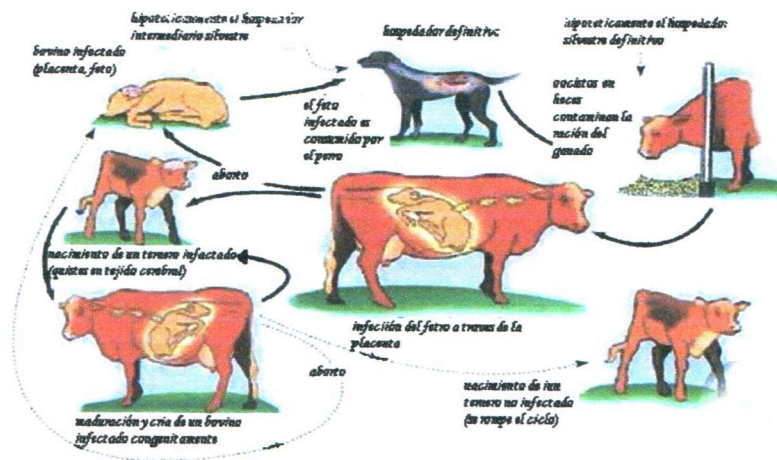


Figura 2. Ciclo biológico de *Neospora caninum*, donde se observa la transmisión horizontal del perro al la vaca y la transmisión vertical transplacentaria en bovinos (Forsythe, 2000).

3. Patogenia e inmunología.

La neosporosis bovina se caracteriza por ser típicamente asintomática y de transmisión congénita, por lo que las hembras infectadas perpetúan el parasitismo de generación en generación, en las explotaciones ganaderas (Michael, 1997).

Determinadas evidencias, como que una cepa aislada del perro es capaz de reproducir la enfermedad experimentalmente en las vacas o que los **taquizoitos**, **bradizoitos** y quistes de procedencia canina tienen las mismas características morfológicas que los hallados en el ganado vacuno e incluso que ambos aislados tienen comportamientos antigénicos prácticamente idénticos, hacen pensar que se trata de una única especie (Cordero y col., 1999).

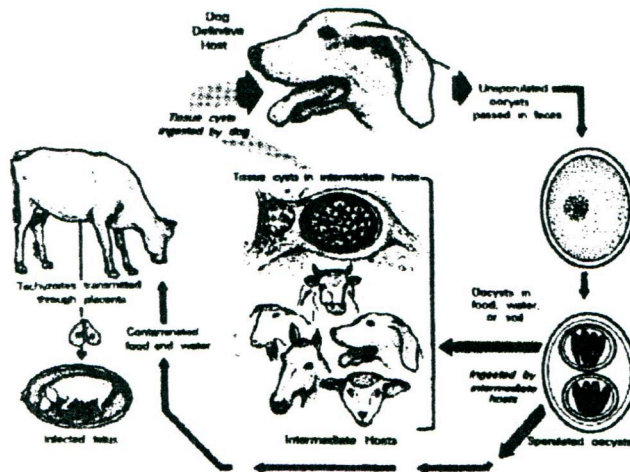


Figura 3. Ciclo biológico de *Neospora caninum*, donde se aprecian los oocistos del hospedador definitivo y los estadios de quistes y taquizoitos en los hospedadores intermedios (Dubey, 1999 a).

El desarrollo sexual exclusivamente toma lugar en los intestinos de los carnívoros, mejor conocido el perro, resultando en la producción de oocistos infecciosos que son excretados con las heces. Miden de 10 a 11 μm , son de forma subsférica y contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos (Mc Allister y col., 1998; Lindsay y col., 1999).

La multiplicación asexual del parásito se observa en un amplio rango de hospedadores intermediarios, incluyendo vacas y otros animales de granja, distinguiéndose dos estados asexuales que son los **taquizoitos** y **bradizoitos**, los **taquizoitos** penetran activamente en las células huéspedes y se dividen rápidamente pudiendo infectar y destruir diferentes tipos celulares, estos pueden ser transmitidos transplacentariamente hacia el feto en los animales preñados. Los **bradizoitos** se dividen muy lentamente y permanecen en estado latente y son enquistados dentro del tejido. Los bradizoitos enquistados en los tejidos, se han encontrado en el tejido neural y muscular de perros y bovinos (Peters, y col., 2001).

La ruta de transmisión mejor descrita e identificada hasta el momento es la vía transplacentaria, la cual parece ser la forma más importante para mantener la infección en los hatos, debido a la eliminación del parásito a través de los fetos abortados o por el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Anderson,

1999; Paré y col., 1996; Dubey, 1999).

La infección en bovinos se inicia como consecuencia de la ingestión de alimentos y agua contaminados por esos ooquistes del intestino de los carnívoros, los parásitos son eliminados en las heces e ingresan al intestino de los bovinos y a partir de la mucosa se diseminan para invadir y multiplicarse en células del cerebro, médula, nervios periféricos y retina, tejidos en los que finalmente forman quistes. En vacas gestantes el parásito se localiza en útero y la placenta e infecta al feto por transmisión vertical (Zambrano y col., 2001).

Aparentemente el parásito se reactiva con la preñez de las vacas y entonces ocurre la transmisión transplacentaria, pudiendo existir tres posibles resultados: La producción de un aborto o de un mortinato; el nacimiento de un ternero aparentemente sano pero con infección persistente; y el nacimiento de un ternero sano sin la infección, en cuyo caso el ciclo se rompe (Benavides, 1992).

El perro se infecta cuando ingiere los fetos, placentas u órganos de bovinos y de otras especies infectados con *N. caninum*. Hoy se conoce que el perro es el huésped definitivo. Una vez que la enfermedad se instala en un hato puede persistir sin la presencia de los perros a través de la transmisión vertical (Paré y col., 1996).

Thurmond y Hietala en 1998 proponen la posibilidad de infección postnatal en bovinos a partir del sexto mes de vida, cuando el animal consume ya una dieta mixta, al consumir forrajes contaminados con materia fecal de caninos u otros carnívoros que actúan como hospedadores definitivos. La transmisión entre carnívoros sucede a través del consumo de tejidos bovinos infectados (Anderson, 1999).

Experimentalmente se ha demostrado la transmisión vertical vía calostrada de la enfermedad (Cebrián y col., 2000).

En los fetos menores a 5 meses de gestación se presenta una necrosis multifocal y presencia de taquizoitos, pero no hay una reacción inflamatoria, esto

sugiere que las células del sistema nervioso central es destruida por multiplicación activa de taquizoitos. Sin embargo, en fetos de 7 meses de gestación y en los becerros recién nacidos hay una marcada respuesta inflamatoria con células conteniendo IgG y quistes tisulares. Esta aparente asociación entre la edad gestacional y el grado de inflamación tisular puede reflejar el desarrollo progresivo del sistema inmune en fetos bovinos (Ogino y col., 1992).

Existen dos mecanismos para la inmunidad protectora contra *N. caninum*. Primeramente el interferón gama (IFN – γ) producido por las células T activan a las células del hospedador (macrófagos) los cuales directamente matan a los parásitos intracelulares como una primera línea de defensa. Enseguida, los linfocitos T CD4⁺ activados por IFN – γ se diferencian tipo Th 1 o citotóxicos en el estadio temprano de la infección. Por lo tanto los linfocitos T CD4⁺ tipo Th 1 producen algunos factores para activar algunas otras células y linfocitos T CD4⁺ citotóxicos que directamente matan a las células infectadas con el parásito. En el estadio tardío de la infección las células T CD4⁺ ayudan a la producción de anticuerpos contra *N. caninum* para inducir otro mecanismo protectoro (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, opsonización). Finalmente, las células infectadas con *N. caninum* se afectan por esta respuesta inmune (Tanaka y col., 2000).

Por otra parte, los anticuerpos encontrados con más frecuencia son las IgM y las IgG. Las IgM son las primeras en elevarse, aunque van desapareciendo gradualmente, mientras que las IgG aparecen más tardíamente pero permanecen con el tiempo, por lo tanto en infecciones agudas es posible encontrar solo elevadas las IgM (Ogino y col., 1992).

4. Manifestaciones clínicas.

Los signos clínicos asociados con neosporosis, diferentes al aborto en bovinos, han sido descritos en becerros menores a 2 meses de edad y se presentan con adelgazamiento, parálisis progresiva y signos nerviosos, con los miembros anteriores y posteriores flexionados o extendidos como se observa en la Figura 4. Los terneros que nacen infectados de forma congénita pueden

presentar sintomatología neuromuscular. Los signos clínicos aparecen normalmente 5 días después del nacimiento aunque pueden aparecer a las dos semanas a dos meses de edad, los terneros que puedan nacer bajos de peso, débiles e incapaces de ponerse de pie (Dubey, y col., 1992; Dubey, 1999).

También hay reportes con signos neurológicos en caninos los cuales inician con una parálisis de miembros anteriores que se extiende lentamente hacia los miembros posteriores (Dubey, 1994; Barber, 1995).

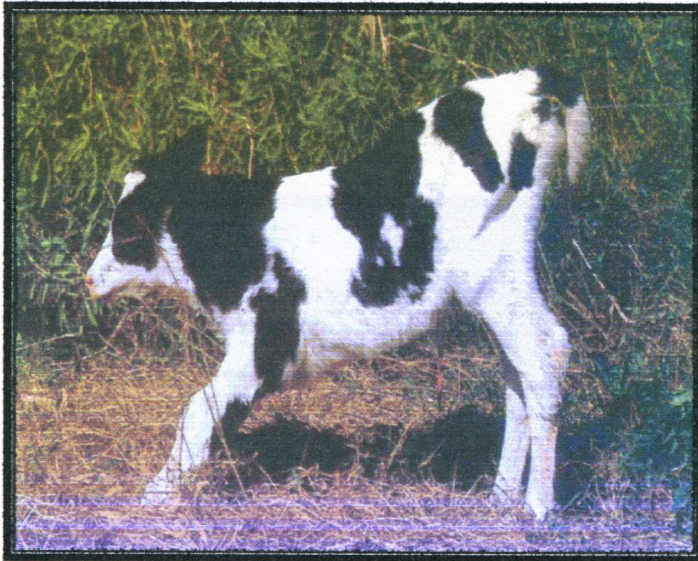


Figura 4. Becerro vivo infectado congénitamente.

El aborto es el único signo clínico observado en las vacas infectadas. pueden abortar entre los 3 meses de gestación a término, sin embargo, la mayoría de los abortos ocurren a los 4 a 6 meses de gestación. Los fetos abortados pueden no presentar alteraciones, pueden morir *in útero*, ser resorbidos, momificados, autolizados, nacer muertos, nacer vivos pero enfermos, o nacer clínicamente normales pero crónicamente infectados (Conrad y col., 1995; Dubey, 1999). Pueden ocurrir abortos en un periodo relativamente corto y las vacas que han abortado a causa de *Neospora caninum* pueden quedar gestantes de nuevo, tener un ternero infectado en forma congénita en el siguiente parto o poder abortar de nuevo (Bryan y col., 1994; Otter y col., 1997).

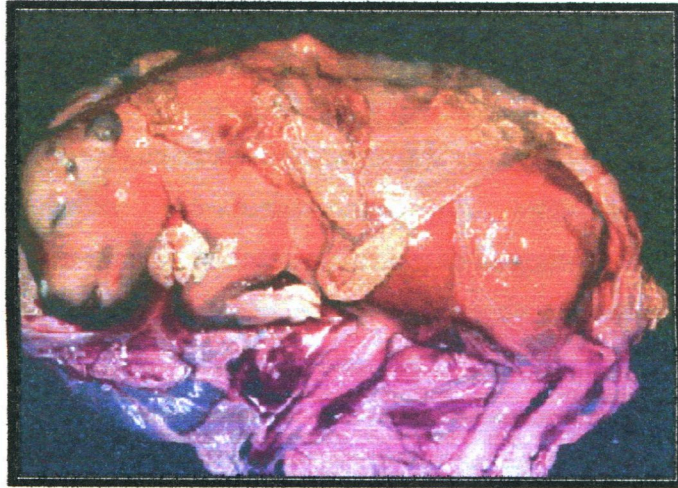


Figura 5. Feto bovino abortado.

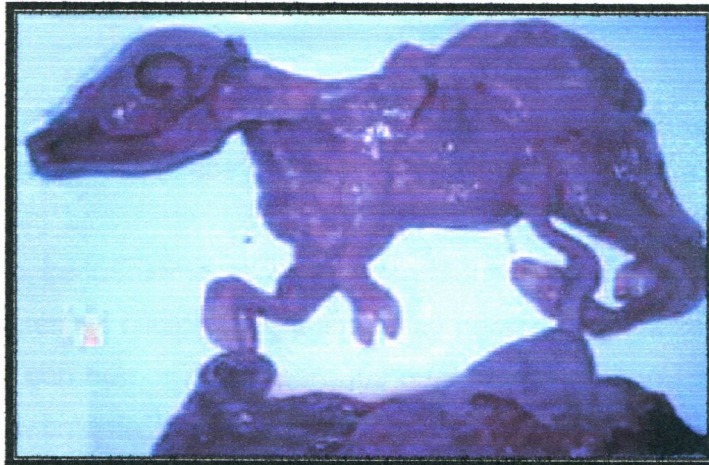


Figura 6. Feto momificado de una vaca positiva a *Neospora caninum* por serología.

5. Lesiones.

Las principales alteraciones en fetos se observan con una encefalitis con necrosis multifocal no supurativa, miocarditis no supurativa, y presencia de quistes tisulares. Histológicamente se encuentra infiltración focal no supurativa, infiltrados con linfocitos, encontrados en diversos órganos. En el encéfalo las lesiones son casuales, pequeños, dispersos focos de gliosis y necrosis. Los focos de necrosis están frecuentemente adyacentes a capilares con hiperplasia del endotelio, e infiltración perivascular de células mononucleares. Además, esos focos de necrosis leve, se encuentran frecuentemente en la materia blanca o tallo cerebral, con axones hinchados eosinofílicos y focos de necrosis rodeados por los

bordes de células gliales. Pueden ser vistos protozoarios en racimos en asociación con esos focos de inflamación, aunque estos son casualmente localizados. En el corazón, los protozoarios se asocian a necrosis con un variado número de células mononucleares infiltradas en el epicardio, entre fibras del miocardio y endocardio, infrecuentemente, la infiltración de células mononucleares son encontradas también en músculo esquelético. En el hígado se encuentran dos formas de inflamación, los infiltrados de células mononucleares presentes en áreas portales y dispersos focos de necrosis hepatocelular. Ocasionalmente se observan focos dispersos de células inflamatorias mononucleares en otros órganos, pequeños focos de necrosis son también encontrados en el intersticio de ambos pulmones (Barr, 1990; Dubey, 1990; Dubey y col., 1992; Conrad, 1993; Barr, 1991; Delgado, 1995; Wouda, 1997; Morales, 1997).

Parish hace mención de una inusual mielitis, necrosis (malacia) y meningitis no supurativas (Dubey, 1989).

El hígado frecuentemente está agrandado con áreas extensas pálidas y con el cuerpo icterico. Microscópicamente hay necrosis centrilobulillar en el 80% del parénquima con hemorragias, pero los organismos no son vistos. Otra lesión es una ligera neumonía piogranulomatosa intersticial y miositis granulomatosa asociada con taquizoítos (Dubey y Lindsay, 1989).

En otras ocasiones las lesiones encontradas en el corazón, hígado y cerebro, consisten en áreas multifocales de edema, hemorragias, además de la necrosis y miositis, e infiltración de neutrofilos y células mononucleares cerca y dentro de las fibras miocárdicas y las fibras de Purkinje. Numerosos taquizoítos intracelulares son encontrados en los miositos y ocasionalmente vistos en las fibras de Purkinje. Estos taquizoítos son encontrados individualmente o en grupo. Las lesiones en cerebro pueden presentar necrosis capilar, neovascularización e infiltración de macrófagos (Dubey, 1990)

McIntosh reporta no haber encontrado lesiones en adrenal, riñones, bazo, pulmón, timo, tiroides, intestino y placenta (McIntosh, 1994), aunque otros

investigadores mencionan que si han encontrado lesiones ocasionales en riñones, pulmones y placenta (Dubey y Lindsay, 1989; Dubey y col., 1992; Lindsay y col., 1993).

6. Epidemiología.

Neospora caninum es un coccidio que afecta principalmente a caninos y bovinos y otras especies silvestres y domésticas; la neosporosis es una enfermedad infecciosa reconocida entre las causas más importantes de aborto en bovinos y enfermedades neurológicas en diversas especies, en países de todos los continentes. La enfermedad fue descrita inicialmente en caninos y posteriormente se encontró como causa de aborto epidémico en bovinos productores de leche a finales de los años 80's en Nuevo México. No obstante, solo en 1989 se reconoció la enfermedad en los bovinos y su diseminación mundial ya que ha sido diagnosticada en Canadá, Estados Unidos, México, Argentina, Brasil, Tailandia, Taiwan, Australia, Nueva Zelanda, Japón y África del sur. En Europa se ha diagnosticado en Italia, Noruega, Suecia, Dinamarca, Holanda, Suiza, Francia, Irlanda y Reino Unido (Bjerkas, 1984; Dubey, 1989; Ogino, 1992, Barr y col, 1992; Delgado, 1995; Lindsay y col, 1996; Baszler, 1996; Morales, 1997; Cordero y col., 1999; Dubey, 1999; Gondim, 1999; Kim, 2000; Ooi, 2000; Guarino, 2000).

En los lugares donde se reporta signología clínica causada por *N. caninum*, la principal manifestación es el aborto con las consecuentes pérdidas económicas que están relacionadas con la reducción en la producción de leche, disminución de la fertilidad, pérdida total de la capacidad reproductora debida a la repetición de los abortos, también con el incremento de la mortalidad perinatal, la muerte de neonatos y la pérdida de animales adultos (Barr y col., 1995; Lindsay y col., 1996; Dubey, 1999).

7. Métodos de diagnóstico.

Considerando que la *neosporosis* puede producir aborto, su diagnóstico se debe orientar hacia la diferenciación con problemas de tipo bacteriano, virales

y protozoarios que cursan con signología similar. Especial énfasis en el diagnóstico diferencial, debe hacerse con *Toxoplasma gondii* por sus características taxonómicas, morfológicas y epidemiológicas. Así mismo, se debe considerar a *Sarcocystis* sp, el cual produce lesiones histológicas similares (Shivaprasad y col., 1989).

Cuando existan manifestaciones clínicas de abortos y se sospeche de infección por *Neospora caninum* las muestras enviadas al laboratorio de diagnóstico deberán ser el suero de la madre, suero o exudados torácicos del feto, el feto entero con su placenta, o en su lugar, muestras de cerebro, médula espinal, corazón, pulmón, músculo esquelético, hígado, riñón, adrenal y placenta fijados en formol al 10%, si no se dispone de formol también se puede fijar las muestras en alcohol para su estudio histológico (Shivaprasad, 1989; Delgado, 1995; Morales, 1997).

El diagnóstico histopatológico se basa en las características necróticas y no supurativas encontradas en varios tejidos principalmente en encéfalo y músculos. (Bjerkas, 1984; Dubey y Lindsay 1989; Barr, 1990; Dubey, 1990; Barr, 1991; Dubey, 1992; Ogino, 1992; Morales y col., 1999; Dubey, 1999).

Para confirmar el diagnóstico histológico se emplean técnicas de inmunohistoquímica que permiten observar **taquizoitos** en los focos de necrosis y de gliosis o la infiltración linfocitaria que rodea el foco necrótico. También nos facilita la observación de quistes tisulares, siendo estos mas frecuentes en fetos abortados al final de la gestación, una vez que se ha desarrollado el sistema inmunitario del feto. Esta técnica tiene una gran especificidad pero baja sensibilidad debido a la escasa presencia del parásito en las lesiones (Dubey, 1989, Barr, 1991a; Barr, 1991b; Dubey, 1992; Conrad, 1993; Anderson, 1996; Morales, 2001).

Para la detección de anticuerpos anti - *Neospora* en suero se puede utilizar la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA Estos métodos nos van a servir para detectar anticuerpos en vacas adultas, animales recién nacidos y fetos abortados. El hallazgo de anticuerpos específicos contra *Neospora* en

líquidos fetales confirma la infección del feto. (Dubey, 1999a). Los títulos de anticuerpos en vacas infectadas suelen aumentar en el periodo alrededor del parto o del aborto. La serología positiva en vacas abortadas no es suficiente para diagnosticar la causa del aborto, pero añadido a las pruebas histológicas, la serología fetal o la presentación clínica de los abortos pueden ayudar a confirmar la enfermedad (Dubey, 1996; Braszler y col., 1996; Jenkins y col., 1997; Medina 1997; Wouda y col., 1997; Michael, y col., 1997; Paré y col., 1998; Cheadle y col., 1999; Stendlund y col., 1999; Dubey, 1999a, Dubey, 1999b; Suteeraparp y col., 1999; Gondim y col., 1999; Ooi y col., 2000; Dyer y col., 2000; Sanderson y col., 2000).

La reacción en cadena de la polimerasa se ha utilizado en forma experimental para la identificación de DNA de *Neospora caninum*, además se ha detectado el DNA en animales infectados naturalmente, en neonatos y abortos, en tejido nervioso y músculo (Michael y col., 1997a; Michael y col., 1997b; McAllister y col., 1998; Kim y col., 2000).

La eficiencia del diagnóstico por PCR depende del laboratorio, estado de autólisis del feto y procedimiento de la muestra. Aunque la demostración inmunohistoquímica de *N. caninum* en lesiones es la mejor evidencia para la etiología del aborto, en el presente, esta prueba es muy insensible. El DNA de *Neospora caninum* puede ser detectado por PCR en tejido cerebral de aborto bovino, fijado en formalina y embebido en parafina (Dubey, 2003).

IV. Justificación

Hasta la fecha se han llevado a cabo varios estudios para identificar la presencia de *N. caninum* en todo el mundo. En México existen reportes serológicos e histopatológicos en Baja California, la Comarca Lagunera, Aguascalientes, Hidalgo y Estado de México, pero no se encontraron reportes en la región menonita del Estado de Chihuahua. Tomando en cuenta éstos antecedentes y considerando la importancia de la enfermedad en la salud animal, ya que repercute económicamente en las explotaciones lecheras, se decidió a

realizar un estudio serológico por medio de la prueba de ELISA para determinar la frecuencia de *N. caninum* en esta región.

V. Objetivos

1. Detectar anticuerpos de *Neospora caninum* en suero de bovinos Holstein de la región menonita del Estado de Chihuahua, utilizando la técnica de ELISA.
2. Conocer la frecuencia de *Neospora caninum* en la región menonita del Estado de Chihuahua.

VI. Material y Métodos

1. Recolección de la muestra.

Las muestras se tomaron en los diferentes campos de la región menonita, para esto se utilizó:

Agujas vacutainer de 21G X 1 ½.

Tubos vacutainer de 10 mL con vacío, sin anticoagulante.

Hielera con refrigerantes para el transporte de las muestras.

Las muestras se trasladaron a un laboratorio regional de análisis clínicos para extraer el suero por medio de centrifugación a 2500 RPM durante 5 minutos. El suero se depositó en un tubo nuevo y se congeló para ser trasladado a la Unidad de Diagnóstico del Departamento de Ciencias Médico Veterinarias, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna.

2. Material para la realización de la prueba.

Placas recubiertas con antígeno.

Conjugado anti-bovino HRPO.

Control positivo de *Neospora*.

Control negativo de *Neospora*. Suero bovino no reactivo frente a *Neospora*.

Diluyente para muestra.

Concentrado para lavado.

Sustrato TMB.

Solución de interrupción.

Agua destilada o desionizada.

3. Equipo para la realización de la prueba.

Pipetas de precisión para depositar de 5, 100, y 500 μL .

Puntillas de pipetas, desechables.

Probeta graduada de 500 mL para solución de lavado.

Lector para placas de 96 pocillos.

Tubos de plástico y de vidrio para diluir muestras.

Dispositivo para depositar y aspirar solución de lavado.

Una fuente de vacío y un recipiente para recoger la solución aspirada.

4. Procedimiento.

a. Preparación de las muestras.

Se diluyeron las muestras a una razón de 1 a 100 con el diluyente para muestras (ejemplo: 5 μL de suero en 500 μL de diluyente) cambiando las puntas de las pipetas en cada muestra y registrando la posición de la muestra en la placa. Se mezclaron las muestras antes de dispersar las muestras en las placas.

b. Preparación de solución de lavado.

El concentrado de lavado se puso a temperatura ambiente y se estuvo agitando para asegurar la dilución de la solución de las sales que se habían precipitado. El concentrado para lavado se diluyó a razón de 1 en 10 con agua

destilada antes de usarlo (ejemplo 30 mL de concentrado en 270 mL de agua destilada).

c. Procedimiento de la prueba.

- Todos los reactivos alcanzaron la temperatura ambiente antes de usarse. Se agitaron suavemente con movimientos circulares.
- Se registró la posición de las muestras en una hoja de trabajo.
- Se colocaron 100 μ L de control negativo sin diluir en los posos A1 y A2.
- Se colocaron 100 μ L de control positivo sin diluir en los posos A3 y A4.
- Se colocaron 100 μ l de de las muestra diluida en los posos apropiados. - Todas las muestras se analizaron en duplicado.
- Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró el líquido de todos los posos y lo desechamos en un recipiente para desechos apropiados.
- Se lavaron cada uno de los posillos con aproximadamente 300 μ l de solución de lavado tamponada con fosfato. Después se aspiró el líquido de los posos en cada lavado evitando que las placas se sequen. Después de la aspiración del lavado final, se golpeo la placa suave y firmemente para transferir el líquido residual al material absorbente.
- Se colocaron 100 μ l de conjugado anti-bovino en cada poso.
- Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se aspiró el líquido de todos los posillos y se desechó.
- Se repitió el paso de lavado.
- Se colocaron 100 μ l de solución de sustrato TMB en cada posillo de la placa.
- Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente
- Se colocaron 100 μ l de solución de interrupción en cada posillo para detener la reacción.
- Se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro con aire como control.
- Se midió y registro la absorbancia (620nm, 630nm y 650nm)
- Se calcularon los resultados.

d. Interpretación de resultados.

Para que el resultado fuera válido, la diferencia entre los controles positivo y negativo (PN) entre el promedio del control positivo (PCx), menos el promedio del control negativo (NCx) tuvo que ser mayor o igual a 0,150. Además el NCx tuvo que ser menor o igual que 0,20.

La presencia o ausencia de anticuerpos contra *Neospora* se determinó al calcular el cociente de muestra con respecto al control positivo (S/P) para cada muestra.

Las muestras de suero con cocientes menores que 0.50 se clasificaron como negativas a la presencia de anticuerpos contra *Neospora*.

Las muestras mayores o iguales a 0.50 se clasificaron como positivas a la presencia de anticuerpos contra *Neospora*.

e. Cálculos.

Cálculo del promedio del control negativo (NCx)

$$NCx = \frac{A1A(650) + A2 A(650)}{2}$$

2

Cálculo del promedio del control positivo (PCx)

$$PCx = \frac{A3 A(650) + A4 A(650)}{2}$$

2

Cálculo del cociente (S/P)

$$S/P = \frac{\text{muestra A (650)} - NCx}{PCx - NCx}$$

PCx - NCx

VII. Resultados

En el muestreo realizado se analizaron un total de 51 muestras de suero de bovino hembras y que tuvieran por lo menos una parición efectiva, las muestras fueron identificadas con un número consecutivo.

Al llevar a cabo la prueba de ELISA se encontraron un total de 24 muestras positivas a la presencia de anticuerpos en contra de *Neospora caninum*, las cuales representaron el 47.05 % y 27 muestras (52.95 %) negativas.

Se obtuvo el promedio de la relación S/P, el cual fue de 0.573, la varianza fue de 0.307 y la desviación estándar de la relación S/P de 0.55.

Cuadro 1. Resultados en porcentajes de la frecuencia de anticuerpos en contra de *Neospora caninum*. En la región menonita del estado de Chihuahua.

X S/P	Varianza	S ²	Resultados	
			Positivo	Negativo
0.573	0.307	0.554	24 (47.05%)	27 (52.95%)

= Promedio

S/P = Relación Muestra / Control Positivo

S² = Desviación Standard

VIII. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum*, lo cual nos confirma que la enfermedad está presente en el ganado lechero del la región menonita del Estado de Chihuahua. Sánchez (2003) menciona que la transmisión vertical es un modo importante de infección que contribuye significativamente a la persistencia de la infección dentro de un hato. Varios estudios indican que el 80 % de las vacas más seropositivas pueden transmitir la infección a su descendencia. Sin embargo la transmisión horizontal también se ha identificado. Además se conoce que la seroprevalencia es mayor en los hatos que tienen presencia de perros a los que no tienen. Otra posible forma de infección sería el contacto con coyotes (Sánchez, 2003).

En México García (2002) encontró presencia de anticuerpos, contra *Neospora caninum*, en 13 hatos analizados con una prevalencia promedio de 59.0 % lo cual indica que los parámetros que se encontraron en nuestro estudio están de acuerdo con éstos.

Pan y col. en el 2004, refirieron que el porcentaje de presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en promedio en varios hatos fue de 11.2 %, sin embargo en individualmente variaban de 0 a 70.4 %.

Bae Ji-Seon en el 2000 refiere que la seroprevalencia en Corea fue de 23.0 % positivos a Neosporosis y que es la causas que produce mas abortos en el ganado, además que produce grandes perdidas económicas.

Guarino en el 2000 encontró prevalencias de 34.6 % en búfalo de agua de los cuales el 24.0 % tenían una edad entre 1 y 2 años, 32.0 % entre 3 y 4 años, 38.6 % de 5 y 6 años y 43.1% eran mayores de 6 años. Estos datos sugieren que la transmisión placentaria no es la ruta más frecuente (Guarino 2000).

Dyer en el 2000 encontró que la prevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* 17.9 % en 107 neonatos, 26.2 % en 233 vaquillas jóvenes y novillos castrados, 39.07 % en vaquillas maduras, y 26.9 % en vacas de ordeño.

Mainar-Jaime reporta que la seroprevalencia de *Neospora caninum* en la región Austria de España era de 30.6 % la cual estaba ligada con el aborto del año anterior y sugirió que las infecciones congénitas tenían cerca del 56% (Mainar-Jaime 1999).

Gondim en 1999 reportó que el 14.0 % de los animales muestreados dieron positivos a *N. caninum* en Bahía Brasil, y solo uno de los 14 hatos muestreados no tubo presencia serológica de neosporosis.

Jenkins en 1997 estudió 10 vacas que presentaron abortos, observando que en éstas los títulos de anticuerpos contra *Neospora caninum* se prolongaron durante la próxima gestación, y después del parto. También se observó que los terneros mantenían títulos de anticuerpos durante los primeros cuatro meses de vida.

Se sugiere que la infección en esta región es debido que el ganado está en constante contacto con perros y coyotes de la región, estos consumen los fetos abortados, becerros muertos y membranas fetales infectadas, lo cual conduce a la dispersión de ooquistes, y contaminación de agua y alimentos que consume el ganado, fuente de transmisión horizontal. En base a esto se hace hincapié en la formulación de prácticas de manejo y control para ayudar a prevenir la transmisión de este protozoario y disminuir la incidencia de aborto.

IX. Conclusión

En la región menonita del Estado de Chihuahua existe una alta prevalencia de *Neospora caninum* (47%).

Barr B. C., Conrad P. A., Dubey J.P., Anderson M. L., (1991b). Neospora-like Encephalomyelitis in calf: Pathology, Ultrastructure and immunoreactivity. *J. Vet Diagn Invest.* 3: 39-46.

Barr B., Anderson M., Severlow K., Conrad P. (1995). Diagnosis of bovine fetal Neospora infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.* 137: 611-613.

Baszler T. V., Knowles D. P., Dubey J. P. Gay J. M., Mathison B. A., McElwain T. F., (1996). Serological diagnosis of bovine Neosporosis by Neospora caninum monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical microbiology.* 34 (6): 1423-1428.

Benavides O. E. (1992). Manual de plagas y enfermedades. Ed No 72.

Bjerkas I., Monh S. F., Presthus J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalitis and miositis in dogs. *Z parasitenkd.* 70: 271-274.

Bryan I. A., Gajadhar A. A., Dubey J. P., Haines D. M., (1994). Bovine neonatal encephalomyelitis associated With A Neospora spp. Protozoan. *Can Vet. J.* 35: 111-113.

Canada N., Meireles C. S., Rocha A., Sousa S., Thompson G., Dubey J. P., Romand S., Thulliez P., Correia da Costa J. M. (2002). First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. *Vet Parasitol.* 110:11-15.

Cebrian L. M., Barberan M., Ferree L. M., (2000). Neosporosis y aborto en Ganado vacuno. Depto. de Patología Animal. Inf. Técnico. Parasitología Laboratorios Provet, S. A.

Conrad P. A., Bard B. C., Sverlow K. W., Anderson M., Daft B, kinde H., Dubey J. P., Munson L., Ardans A., (1993). *In vitro* Isolation and Characterization of a *Neospora spp* From Aborted Fetuses. *Parasitology.* 106: 239-249.

- Cordero C. M., Rojo V. F. A., Martínez F. A. R., Sánchez A. M. C., Hernández R. S., Navarrete L. I., Díez B. P., Quiroz R. H., Carbalino V. M.,** (1999). *Parasitología Veterinaria*. McGraw Hill. 1ª edición. 330-332 y 668-669
- Delgado G. R., Quintero C. J.,** (1995). Estudio patológico, microbiológico y serológico del aborto bovino en la Comarca Lagunera, XIX Congreso Nacional de Buiatria. Torreón, Coahuila. Pag. 74-77.
- Dubey J. P.** (1999a). Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *Vet med today*. 214 (8) : 1160-1163.
- Dubey J. P.** (1999b). Neosporosis a newly recognized protozoan disease similar to toxoplasmosis. *Medical veterinary* 1 (2): 129-130
- Dubey J. P.,** (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41 (1) : 1-6.
- Dubey J. P., Janovitz E. V., Skowronek A. J.,** (1992b). Clinical Neosporosis in a 4-Week-old Hereford Calf. *Veterinaria Parasitology* 43: 137-141.
- Dubey J. P., Leathers C. W., Lindsay D. S.,** (1989a). Neospora- like protozoon Associated With Fatal Myelitis in Newborn Calves. *J parasitol* 75 (1) :146-148
- Dubey J. P., Lindsay D. S.,** (1993). Neosporosis. *Parasitology Today*. 9: 452-458
- Dubey J. P., Morales J. A., Villalobos P., Lindsay D. S., Blagborn B. L., Topper M. J.** (1996). Neosporosis Associated Abortion in a Dairy Goat. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208: 263-265
- Dubey J. P., Stauffer M., Lindsay D. S., Topper M. J.,** (1990). *Neospora caninum*-Associated Myocarditis y Encephalitis in Aborted Calf. *J vet diagn invest.* 2: 66-69.
- Dubey J. P., Lindsay D. S.,** (1989b). Fetal *Neospora caninum* Infection in Kittens. *J parasitol.* 75 (1) : 148- 151.

- Dubey J.P., Lindsay D. S., Anderson M. I., Davis S. W., Shen S. K.** (1992a). Induced Transplacental Transmission of *Neospora caninum* in Cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201 (5): 709-714.
- García V. Z., Cruz V. C., L. Medina E., García-T. D., Chavarria M. B.** (2002). Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology* 106: 115-120.
- Gennari S. M., L. E.Yai, S. N. R. D'Áuria, S. M. S. Cardoso, O. C. H. Kwok, M. C. Jenkins and J. P. Dubey.** (2002). Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of São Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 106 (2) : 177-179.
- Gondim L. F. P., Sartor I. F., Hasegawa M., Yamane I.,** (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *J Veterinaria Parasitology* 86: 71-75.
- Guarino A., Fusco G., Savini G., Di Francesco G., Cringoli G.,** (2000). Neosporosis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *J. veterinary Parasitology* 91: 15-21.
- Gupta G. D., Lakritz J., Kim J. H., Kim D. Y., Kim J. K., Marsh A. E.** (2002). Seroprevalence of *Neospora*, *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from Jeju island, South Korea. *Veterinary Parasitology*, 106 (3): 193-201.
- Hamir A., Tornquist S., Gerros T., Topper M, Dubey J. P.,** (1998). *Neospora caninum*-associated equine protozoal myeloencephalitis. *Veterinaria parasitology.* 27 (79): 269-274.
- Jae-Hoon K., Sohn H-J, Hwang W-S., Hwang E-K., Jean Y-H., Iyamane, Kim D-Y.** (2000). In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Veterinary Parasitology.* 90:147-154
- Jenkins M. C., Wouda W., And Dubey J. P.** (1997). Serological Response over Time to Recombinant *Neospora caninum* Antigens in Cattle after a Neosporosis-Induced Abortion. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 4 (3): 270-274

Kim J. H., Sohn H. J., Hwang W. S., Hwang E. k., Jean Y. H., Yamane I., Kim D. Y., (2000). In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *J. Veterinary Parasitology* 90: 147-154.

Lindsay D., Dubey J. P., Duncan R., (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology*, 82: 327-333

Lindsay D., Dubey J., Blagburd B., (1996) Finding the cause of parasite induced abortions in cattle. *Veterianry medicine*: 64-71

Mainar-Jaime R. C., Thurmond M. C. , Berzal-Herranz B., and Hietala S. K., (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *The Veterinary Record*, 145 (3): 72-75

McAlister M. M., Dubey J. P., Lindsay D. S., Jolley W. R., Willis R. A., McGuire (1998) Dog are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitology*. 28 (9): pp1473-1478.

McDole M. G., Gay J. M., (2002). Seroprevalence of antibodies against *Neospora caninum* in diagnostic equine serum samples and their possible association with fetal loss. *Vet. Parasitology*. 105 (3): 257-260

McIntosh D. W., Haines D., (1994). *Neospora* infection in an Aborted Fetus in British Colombia. *Can vet J*. 35:114-115.

Michael S. Y., Barr B. C., Rowe J. D., Anderson M. L., Sverlow K. W., packhan A., Marsh A. E., Conrad P. A., (1997). Detection of *Neospora spp* from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J parasitol* 83 (3): 508-514

Morales E., Ramírez J., Trigo F., Ibarra F., Puente E., Santa Cruz M., (1997). Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora sp* en México. *Vet. Méx.* 28 (4):253-257

Ogino H., Watanabe E., Watanabe S., Agawa H., Narita M., Haritani M., Kawashima K. (1992). Neosporosis In Aborted Fetus and Newborn Calf. *J. Comp. Phathology*. 107: 231-237.

Ooi H. K., Huang C. C., Yang C. h., Lee S. h., (2000). Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, an the detection of is it antibodies in various body fluids of cattle. *J. Veterinary Parasitology* 90: 47-55.

Osawa T., Wastling J., Maley S., Buxton D., Innes E. A., (2002) Erratum to "A multiple antigen ELISA to detect *Neospora*-specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera" [Vet. Parasitol. 79 (1998) 19-34]. *Veterinary Parasitology*.106 (3): 273

Pan G Y., Jansen B., Duffield T. F., Hietala S., Kelton D., Lin C. Y., and Peregrine A. S. (2004). Genetic Susceptibility to *Neospora caninum* Infection in Holstein Cattle in Ontario. *J. Dairy Sci.* 87: 3967–3975

Pare J., Thurmond M. C., y Hietala S. K., (1996). Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle an associated calphoon mortality. *Can J. Vet.* 60: 133-199

Poli A., Mancianti F., Carli M. A., Kramer L., (1998). *Neospora caninum* infección en un cattle dog from Italy. *Veterinaria parasitology.* 78: 79-85.

Rojas C. M. (2003). *neospora caninum*, Rev. Virtual de Parasitologia Veterinaria Peruana. [http. www.visionveterinaria.com/tpp.html](http://www.visionveterinaria.com/tpp.html).

Sánchez G. F., Morales S. E, Martínez M. J., Trigo J. F., (2003) Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can J Vet Res.* 67:142-145

Rauser M, Schröder R., Peters M., Wurm R., Selhorst T., Conraths F. J. (2002) p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Shivaprasad H. L., Ely R., Dubey J.P., (1989). A *Neospora*-like protozoon fund in an aborted bovine placenta. *J Veterinari Parasitology.* 34: 145-148

Shkap V., Reske A., Pipano E., Fish L., Baszler T. (2002). Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Veterinary Parasitology.* 106 (1): 35-43

Tanaka T., Hamada T., Inoue N., nagasawa H., Fujisaki K., Suzuki N., Mikami T., (2000). The role of CD4+ or CD8+ T cell in protective immune response af BALB/c mice to *Neospora caninum* infection. *Veterinaria Parasitology* 90: 183-191.

www.chihuahua.gob.mx/cies/Nueva%20Estructura/I.%20Perfil%20Economico%20de%20Chihuahua/estado.htm

www.presidenciacuauhtemoc.org/

Zambrano J. L., Cotrino B. V., Jimenez E. C., Romero M., Guerrero B., (2001). Evaluación serológica de *Neospora caninum* en bovinos en Colombia. *Rev. Acovez.* 26 (1): 5-10