



## NEOSPOROSIS BOVINA EN RANCHOS GANADEROS DE LA ZONA NORTE DEL ESTADO DE VERACRUZ, MÉXICO

### [BOVINE NEOSPOROSIS IN CATTLE FARMS FROM THE NORTHERN REGION OF THE STATE OF VERACRUZ, MEXICO]

Tomás Montiel-Peña<sup>1</sup>, Dora Romero-Salas<sup>1\*</sup>, Zeferino García-Vázquez<sup>2</sup>,  
Leticia Medina-Esparza<sup>3</sup> y Carlos Cruz-Vázquez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Circunvalación y Yáñez s/n, Col. Unidad Veracruzana. C.P. 91710, Veracruz, Veracruz, Mexico. montiel\_p.t@hotmail.com, dromero@uv.mx

<sup>2</sup>INIFAP, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8534, C.P. 62550, Jiutepec, Morelos, México. garciaz\_1948@yahoo.com,

<sup>3</sup>Instituto Tecnológico Agropecuario El Llano Aguascalientes. Km. 18 Carretera Aguascalientes-San Luis Potosí, El Llano, C.P. 20330, Aguascalientes, México.

lmedinaesparza@yahoo.com.mx, cruva18@yahoo.com.mx

\*Autor para correspondencia: dromero@uv.mx

#### RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la presencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* y de ADN de *N. caninum* en muestras de sangre de hembras bovinas del norte del estado de Veracruz, México. Se realizó un estudio epidemiológico transversal en 13 municipios, con tamaño de muestra de 821 bovinos. Las muestras de suero y sangre fueron analizadas mediante ELISA y PCR, respectivamente. La prevalencia general de neosporosis fue 20.8 %; las mayores prevalencias específicas correspondieron al ganado pie de cría (27.4 %), vacas cruzadas (20.9 %), vacas de segundo parto (23.2 %), vacas de tres años (20.6 %) y vacas con antecedentes de aborto (20 %). Los factores de riesgo asociados con la seropositividad fueron el ganado lechero (OR = 1.9; IC<sub>95 %</sub>: 1.1-3.4) y la presencia de perros en los ranchos (OR = 5.3; IC<sub>95 %</sub>: 1.3-22.3). Se demostró la presencia de ADN de *N. caninum* en 4 de 12 muestras estudiadas, lo que evidenció la existencia de infección activa. En conclusión, hubo factores de riesgo asociados con neosporosis bovina, lo que comprobó la existencia de infección activa de *N. caninum* en vacas del estado de Veracruz, México.

**Palabras clave:** *Neospora caninum*; prevalencia; factores de riesgo; PCR; ELISA; bovino.

#### INTRODUCCIÓN

*Neospora caninum* es un protozooario perteneciente al Phylum Apicomplexa. Es considerado como la

#### SUMMARY

The aim of the study was to determine the presence of antibodies against *Neospora caninum* and its DNA in blood samples from bovine females from the northern region of the state of Veracruz, Mexico. A cross-sectional epidemiological study was carried out in 13 municipalities, with a sample size of 821 animals. Blood and serum samples were analyzed through ELISA and PCR, respectively. Overall prevalence was 20.8 %; the highest specific prevalences were obtained in breeding cows (27.4 %), crossbred cows (20.9 %), second-calving cows (23.2 %), three year-old cows (20.6 %) and cows with abortion history (20 %). The risk factors associated with seropositivity were dairy cattle (OR = 1.9; IC<sub>95 %</sub>: 1.1-3.4) and dog presence in the farms (OR = 5.3; IC<sub>95 %</sub>: 1.3-22.3). The presence of *N. caninum* DNA was demonstrated in 4 out of 12 blood samples tested, which evidenced the existence of active infection. In conclusion, there were risk factors associated with bovine neosporosis, which proved the existence of active infection by *N. caninum* in cows from the state of Veracruz, Mexico.

**Key words:** *Neospora caninum*; prevalence; risk factors; PCR; ELISA; bovine.

principal causa de abortos en ganado bovino y se ha reportado como una enfermedad emergente en perros y bovinos (Dubey *et al.*, 2007); su presencia se ha confirmado por la infección experimental en vacas

gestantes, observándose abortos y muerte en neonatos (Barr *et al.*, 1993, 1995). En ganado lechero infectado por *N. caninum* la producción láctea disminuye hasta 4 % (Hernández *et al.*, 2001). El ganado productor de carne también puede verse afectado por este parásito (Dubey, 2003), y aunque no se ha relacionado con alteraciones en ganancia de peso (Tennet-Brown *et al.*, 2000), sí se ha reportado la presencia de abortos en este tipo de ganado infectado con *N. caninum* (Hoar *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997; Waldner *et al.*, 1998).

El perro (*Canis lupus familiaris*) es el hospedero doméstico definitivo de *N. caninum* (McAllister *et al.*, 1998), y el coyote (*Canis latrans*) funge como el hospedero silvestre (Gondim *et al.*, 2004b), y por esto la presencia de estas especies de caninos en los ranchos ganaderos de España, Estados Unidos, Alemania, Brasil y México ha sido considerada en los últimos años como factor de riesgo para el contagio de la enfermedad (Pare *et al.*, 1998; Mainar-Jaime *et al.*, 1999; Schares *et al.*, 2004; Corbellini *et al.*, 2006; Cruz-Vázquez *et al.*, 2008). Se ha reportado que los perros que viven en los ranchos ganaderos tienen prevalencias más altas de anticuerpos contra *N. caninum* que los que viven en áreas urbanas (Antony y Williamson, 2003; Cruz-Vázquez *et al.*, 2008).

En bovinos, la transmisión vertical es la principal vía de infección por *N. caninum*, ya que la transmisión horizontal por el consumo de alimento y agua contaminados por ooquistes es poco frecuente (Davison *et al.*, 1999; Bergeron *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2007); sin embargo, esta vía de infección está relacionada con el número de ooquistes ingeridos (Gondim *et al.*, 2004a). La neosporosis bovina puede ser diagnosticada por serología mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (Moore *et al.*, 2003) y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Otras pruebas diagnósticas utilizadas son histopatología e inmunohistoquímica (Baszler *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 2001a; Serrano-Martínez *et al.*, 2007). Se han utilizado pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se ha hecho en tejidos frescos o fijados en formalina (Baszler *et al.*, 1999), y en últimos años se ha implementado en sangre (Okeoma *et al.*, 2004).

En México, la prevalencia general de neosporosis bovina reportada mediante serología es de 42, 59 y 72 % en ganado lechero, y a nivel ható el rango de prevalencias va de 10 a 100 % (Morales *et al.*, 2001b; García-Vázquez *et al.*, 2002, 2005). En ganado productor de carne la prevalencia varía de 8.6 a 15 % en el sureste del país (García-Vázquez *et al.*, 2009). Mediante inmunohistoquímica se ha reportado

presencia de *N. caninum* en 72.6 % de muestras analizadas (Morales *et al.*, 2001a), mientras que por PCR realizada a tejido cerebral la prevalencia fue 80 % (Medina *et al.*, 2006). En ganado bovino de doble propósito no existe información sobre factores de riesgo asociados a la infección por neosporosis. Los objetivos del estudio fueron determinar la seroprevalencia de neosporosis bovina en la zona norte del estado de Veracruz, México, identificar posibles factores de riesgo y determinar la presencia de ADN de *N. caninum* por medio de PCR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Características del estudio

El estudio se realizó de febrero 2008 a diciembre 2009 en ranchos de ganado bovino localizados en municipios de la zona norte del estado de Veracruz, México. Los criterios de inclusión de los animales experimentales fueron: hembras bovinas productoras de carne, de leche y de doble propósito, en edad reproductiva (uno a siete años de edad), con o sin antecedente de abortos. Los criterios de exclusión fueron: machos, hembras con enfermedades crónico-degenerativas y con mala condición corporal.

### Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se calculó utilizando la fórmula para determinar el número de conglomerados (municipios) y la proporción de animales en la población (Segura y Honhold, 2000). Se utilizó 5 % de error, nivel de confianza de 95 %, prevalencia esperada de 10 % y un total de 48 conglomerados que representan a todos los municipios de la zona norte del estado de Veracruz, con lo que se obtuvo una  $n = 13$  municipios. Así, se seleccionó una muestra al azar en 13 de los 48 municipios que conforman la zona norte del estado. Dentro de los municipios se realizó un muestreo por conveniencia en 71 ranchos, y se muestrearon al menos cuatro por cada municipio. En cada rancho se obtuvo una muestra mínima de uno y máxima de 14 bovinos, seleccionados de manera aleatoria (en forma sistemática), previa aplicación de criterios de inclusión y exclusión preestablecidos. El total de bovinos incluidos en el estudio fue de 821.

### Toma de muestras

De cada hembra incluida en el estudio, mediante punción de la vena coccígea o yugular se obtuvo una muestra sanguínea de 10 ml en tubos al vacío sin anticoagulante; las muestras se transportaron en refrigeración al laboratorio. La sangre se centrifugó a

1000 x g durante 15 min para separar el suero, el cual fue depositado en viales de poliestireno de 1.5 ml que se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis. Posteriormente, en tres ranchos en donde se detectaron hembras seropositivas a *N. caninum* mediante la prueba de ELISA mencionada a continuación, se eligieron al azar 12 hembras seropositivas con y sin antecedentes de aborto para determinar la presencia de ADN de *N. caninum* mediante PCR.

### Prueba de ELISA

Esta prueba se utilizó para la identificación de anticuerpos IgG anti-*Neospora* en el suero de los animales muestreados. Para realizarla se empleó un kit comercial (sensibilidad 100 % y especificidad 98.9 %; IDEXX®–Laboratories Inc., Westbrook, Maine USA; Bartels *et al.*, 2005).

### Prueba de PCR

Para la extracción de ADN de la sangre obtenida de las hembras seropositivas a *N. caninum* mediante la prueba de ELISA y que tenían o no antecedentes de aborto, se utilizó un kit comercial (Ultraclean DNA BloodSpin® MOBIO Lab.), siguiendo las instrucciones del fabricante. En total 12 muestras fueron analizadas por PCR anidado en un solo tubo para *N. caninum* de acuerdo con lo reportado por Ellis *et al.* (1999). Los iniciadores utilizados fueron NF1, NS1, NR1 y SR1, sintetizados por Invitrogen™ (EUA). Para la preparación del PCR anidado se utilizaron 5.0 µL de muestra de ADN genómico, 2.5 µL de NS1 y 2.5 µL de NR1 al 50 µM, 2.5 µL de NF1 y 2.5 µL de SR1 al 1 µM, y 25 µL de Platinum PCR Super Mix (Invitrogen™), obteniendo un volumen total de la reacción de 50 µL. El tiempo promedio de duración de reacción de la mezcla en el termociclador fue de 2 h y 50 min. Posteriormente, el producto se procesó en gel de agarosa al 2.5 % para su corrimiento por 60 min en una cámara de electroforesis, incluyéndose los controles positivo y negativo de ADN de *N. caninum*, y un marcador de peso molecular de un rango de 1,350 a 72 pb (Phix174 DNA, Gibco, BRL). Una vez obtenido el gel de agarosa, se colocó en un transiluminador de luz ultravioleta para identificar las bandas de 146 pb.

### Colecta de datos

En cada rancho incluido en el estudio se aplicó un cuestionario individual para identificar a los bovinos muestreados, donde se incluyó la identificación del animal, edad, raza, número de partos, número de

abortos y tiempo de ocurrencia del aborto; además, se aplicó un cuestionario general para identificar a los ranchos, donde se incluyó el número de cabezas, distribución por etapas del ganado, antecedentes reproductivos, manejo de placentas y fetos, presencia de perros en el rancho y si tenían acceso al área de los bovinos, tipo de alimentación y fuente del agua de bebida de los animales.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva y se determinaron las diferencias entre proporciones con Chi-cuadrada, usando el paquete estadístico SPSS® ver. 17.0. Se calcularon los intervalos de confianza al 95 % y se determinaron los factores de riesgo con el paquete Vassar Stats®.

## RESULTADOS

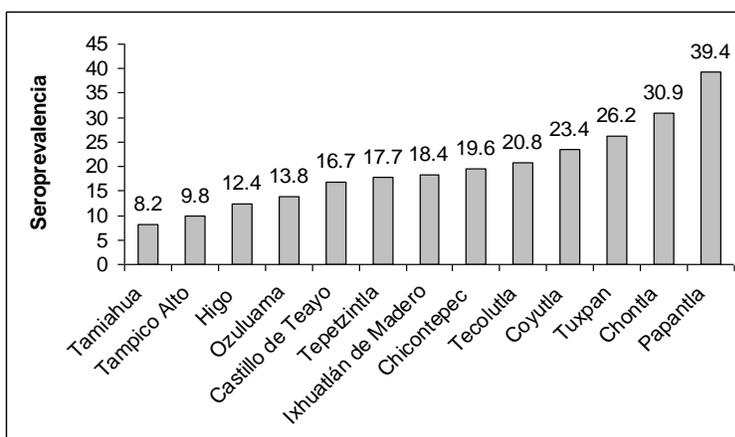
### Seroprevalencia

Se obtuvo seroprevalencia general de neosporosis de 20.8 %. El rango de seroprevalencias por municipio fue de 8.2 a 39.4 %, obtenidas en Tamiahua y Papantla, respectivamente (Figura 1).

En el estado de Veracruz existen cuatro sistemas de producción de ganado bovino (carne, leche, doble propósito, pie de cría), y de acuerdo a estos criterios, el sistema de producción de leche tuvo la seroprevalencia más baja (16.5 %), mientras que el sistema de pie de cría tuvo la mayor seroprevalencia (27.4 %; Tabla 1). Al analizar las diferencias entre proporciones no se encontró diferencia entre el sistema de carne y de pie de cría ( $P > 0.05$ ), pero sí entre éstos y el de producción de leche y de doble propósito ( $P < 0.05$ ), y de igual forma entre estos dos últimos ( $P < 0.05$ ; Tabla 1).

El rango de prevalencias por raza fue de 0 a 33.3 % (Tabla 2), aunque para estos casos el tamaño de muestra fue pequeño para la raza de ganado de leche especializado, lo que puede ser un sesgo de los resultados. Aunque las vacas cruzadas y la de raza Suizo Pardo tuvieron un tamaño de muestra mayor y una seroprevalencia similar (20.9 y 21.2 %, respectivamente), se encontró diferencia estadística entre ambas ( $P < 0.05$ ; Tabla 2).

Las hembras de dos años de edad tuvieron la seroprevalencia más baja (15.2 %), seguidas del grupo de tres años (24.1 %). En las hembras de cuatro a siete años de edad la prevalencia se mantuvo en el rango de 20 a 24 % (Figura 2).



**Figura 1.** Seroprevalencia (%) de anticuerpos anti-*Neospora caninum* obtenida por municipio en hembras bovinas de la zona norte del estado de Veracruz, México.

**Tabla 1.** Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en hembras bovinas de acuerdo con el sistema de producción, en la zona norte del estado de Veracruz, México.

Sistema de producción	No. hembras muestreadas	No. hembras positivas	Prevalencia %	IC <sub>95</sub> %
Carne	113	22	19.5 <sup>a</sup>	12.8-28.2
Leche	115	19	16.5 <sup>b</sup>	10.4-24.8
Doble propósito	356	65	18.3 <sup>c</sup>	14.4-23.7
Pie de cría	237	65	27.4 <sup>a</sup>	21.9-33.6
Total	821	171	20.8	18.1-23.8

<sup>a,b,c</sup>Diferente literal indica diferencia estadística (P < 0.05).

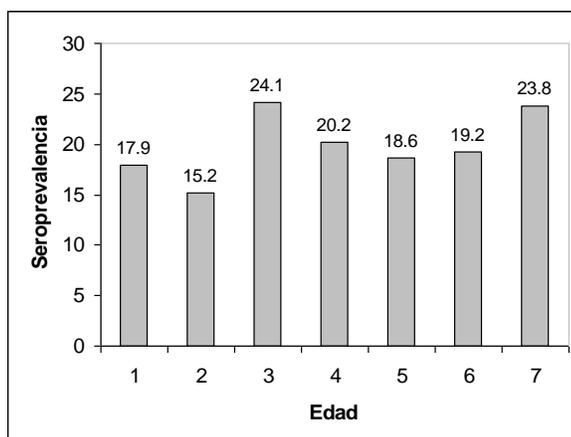
**Tabla 2.** Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* de acuerdo con la raza de hembras bovinas en la zona norte del estado de Veracruz, México.

Raza	No. hembras muestreadas	No. hembras positivas	Prevalencia %	IC <sub>95</sub> %
Beefmaster	23	2	8.7 <sup>a</sup>	1.5-29.5
Cebú	31	7	22.6 <sup>a</sup>	10.2-41.5
Charolais	15	5	33.3 <sup>a</sup>	12.9-61.3
Cruza	511	107	20.9 <sup>b</sup>	17.5-24.7
Holstein	4	0	0	0
Simbrah	11	3	27.3 <sup>a</sup>	7.3-60.6
Simmental	4	0	0	0
Suizo Pardo	222	47	21.2 <sup>c</sup>	16.1-27.2
Total	821	171	20.8	18.1-23.8

<sup>a,b,c</sup>Diferente literal indica diferencia estadística (P < 0.05).

En cuanto a la etapa zootécnica de los bovinos, se observó la mayor seroprevalencia en novillonas (23.5 %). Cabe mencionar que el número de novillonas muestreadas fue reducido, lo que podría sesgar el resultado. La vacas de segundo parto tuvieron

seroprevalencia alta (23.2%). En bovinos de todas las etapas zootécnicas se encontraron anticuerpos contra *N. caninum*. No hubo diferencias estadísticas (P > 0.05) entre los diferentes tipos de animales (Tabla 3).



**Figura 2.** Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* de acuerdo con la edad (años) de hembras bovinas en la zona norte del estado de Veracruz, México.

**Tabla 3.** Seroprevalencia de anticuerpos anti-*Neospora caninum* de acuerdo con la etapa zootécnica de hembras bovinas en la zona norte del estado de Veracruz, México.

Etapa zootécnica	No. hembras muestreadas	No. hembras positivas	Prevalencia %	IC <sub>95</sub> %
Novillona	34	8	23.5 <sup>a</sup>	11.3-41.5
Vaquilla	42	7	16.7	7.5-31.9
Vaca 1er parto	145	30	20.7	14.6-28.3
Vaca 2º parto	138	32	23.2	16.6-31.2
Vaca de 3-5 partos	359	74	20.6	16.6-25.2
Vaca > 5 partos	103	20	19.4	12.5-28.6
Total	821	171	20.8	18.1-23.8

<sup>a</sup>Sin diferencia estadística (P>0.05)

### Factores de riesgo

De los factores de riesgo estudiados, se determinó que el ganado lechero tiene 1.9 veces más probabilidad de ser seropositivo a *N. caninum* (OR = 1.1; IC<sub>95</sub> %: 1.1-3.4; P = 0.02); de igual forma, el ganado de doble propósito tiene mayor probabilidad de estar infectado con *N. caninum*, (OR = 1.3; IC<sub>95</sub> %: 0.9-1.8; P = 0.11). La seroprevalencia en los ranchos donde se reportó la presencia de perros fue 56.3 %, y se encontró asociación entre seroprevalencia a *N. caninum* y presencia de perros en los ranchos (OR = 5.3; IC<sub>95</sub> %: 1.3-22.3; P = 0.01; Tabla 4).

### Identificación de ADN de *Neospora caninum* por la técnica de PCR anidado

En cuatro de las 12 hembras que resultaron seropositivas a *N. caninum* mediante la prueba de

ELISA, que contaban o no con antecedentes de aborto, se logró la identificación de ADN de *N. caninum* (Figura 3); de las cuatro muestras positivas, dos pertenecían al mismo rancho, y las restantes a ranchos diferentes.

### DISCUSIÓN

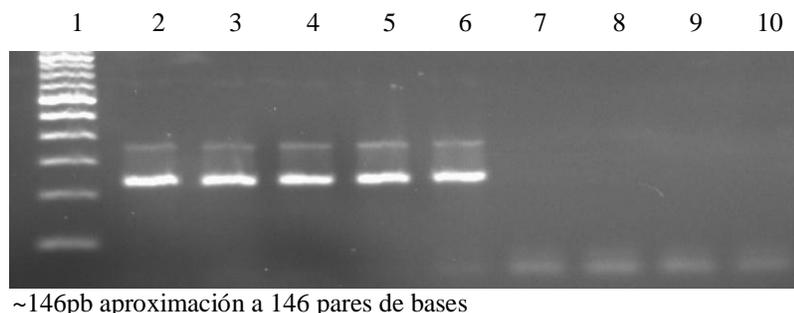
La prevalencia reportada para *N. caninum* en México varía de acuerdo con la región y la prueba diagnóstica empleada. Al respecto, Morales *et al.* (2001a,b) en ganado Holstein reportaron seroprevalencia de 77 % mediante inmunohistoquímica y 72 y 36 % mediante ELISA, mientras que García-Vázquez *et al.* (2002) y Medina *et al.* (2006) obtuvieron 59 % con ELISA, 80 % por PCR y 45 % por histopatología, también en ganado lechero en Aguascalientes.

La prevalencia por función zootécnica obtenida en este estudio difiere de la reportada por García-Vázquez *et al.* (2009), quienes en Veracruz observaron seroprevalencia de 8.6 % en ganado productor de carne. En Australia también se notificó una prevalencia baja (2.8 %) para este tipo de ganado (Tennent-Brown *et al.*, 2000), al igual que en

Argentina, donde fue de 4.7 % (Moore *et al.*, 2003). En estudios realizados en México en ganado lechero se han reportado seroprevalencias de 59 % en Aguascalientes (García-Vázquez *et al.*, 2002), y de 42 % (García-Vázquez *et al.*, 2005) hasta 72 % (Morales *et al.* 2001b) en Coahuila y Querétaro en sistemas lecheros intensivos.

**Tabla 4.** Factores de riesgo asociados a la seropositividad a *Neospora caninum* en hembras bovinas de diferentes ranchos en la zona norte del estado de Veracruz, México.

Factor	No. hembras muestreadas	Prevalencia (%)	OR	IC <sub>95</sub> %	P
Función zootécnica					
Pie de cría	237	27.4	1		
Leche	115	16.5	1.1	1.1-3.4	0.02
Doble propósito	356	18.3	1.3	0.9-1.8	0.11
Carne	113	19.5	1.1	0.6-1.8	0.71
Presencia de perros					
	No. ranchos muestreados				
No	28		1		
Sí	43	56.3	5.3	1.3-22.3	0.02



~146pb aproximación a 146 pares de bases

**Figura 3.** Productos de amplificación por PCR de *Neospora caninum* en hembras bovinas de la zona norte del estado de Veracruz, México. Carril 1: marcador de peso; carril 2: control positivo; carril 3-6: productos de ADN de vacas positivas; carril 7-10: vacas negativas.

En este estudio, se observó que la infección está presente en la todas las razas estudiadas, y por lo tanto este no es un factor que influya sobre la prevalencia; en la zona centro del estado de Veracruz, Romero *et al.* (2010) reportaron que las vacas cruzadas presentaron la mayor seroprevalencia, con 27.4 %.

Un factor importante que influye en la seroprevalencia de *N. caninum* es la edad de los bovinos, ya que se ha demostrado que la seropositividad se incrementa con la edad (Jensen *et al.*, 1999; Dyer *et al.*, 2000; Sanderson *et al.*, 2000; Rinaldi *et al.*, 2005). Sin

embargo, algunos estudios demuestran lo contrario (Bartels *et al.*, 2006a; García-Vázquez *et al.*, 2009), pues mencionan que la edad no se relaciona con la seropositividad ni incrementa el riesgo de infección. Los resultados de este estudio coinciden con lo propuesto por Davison *et al.* (1999), quienes identificaron la seroprevalencia más baja en animales de uno y dos años de edad, y la más alta en animales mayores de dos años. Otro estudio en la zona centro del estado de Veracruz reportó mayor seroprevalencia en bovinos de cuatro años de edad y la menor en animales de un año (Romero *et al.*, 2010). En México

en ganado productor de carne, García-Vázquez *et al.* (2009) indicaron la mayor seroprevalencia (19.6 %) en animales de cuatro años de edad.

A pesar de que son escasos los datos a nivel nacional que incluyan la etapa zootécnica de los bovinos como variable estudiada y que puedan ser comparados con los resultados obtenidos en este estudio, existe un reporte en el estado de Veracruz que señala la mayor seroprevalencia en vacas de segundo parto (32.1 %; Romero *et al.*, 2010).

Diversos estudios que han determinado los principales factores de riesgo asociados a la infección por *N. caninum* (Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011), han demostrado que la presencia de perros en los ranchos (Bartels *et al.*, 2006a), fauna silvestre (Gondim *et al.*, 2004b), edad del ganado, raza, procedencia de reemplazos y el antecedente de aborto (García-Vázquez *et al.*, 2005) son los principales factores de riesgo asociados con la neosporosis. Sin embargo, no se ha utilizado la función zootécnica para establecer la posible asociación con la seropositividad a *N. caninum*, ya que los estudios se concentran en estudiar un solo sistema de producción, como ganado productor de carne (Tennet-Brown *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2003) y ganado lechero (Bartels *et al.*, 1999; García-Vázquez *et al.*, 2002, 2005; Bartels *et al.*, 2005, 2006a,b, 2007).

En este estudio se determinó que en los ranchos donde se encontraban perros se tenía el mayor riesgo de ser seropositivos, lo que coincide con reportes previos que señalan esta asociación (Pare *et al.*, 1998; Mainar-Jaime *et al.*, 1999; Schares *et al.*, 2004; von *et al.*, 2004; Corbellini *et al.*, 2006) En Brasil la prevalencia reportada para ranchos donde hay convivencia con perros fue de 17.8 % (Corbellini *et al.* 2006), y el factor de riesgo con seropositividad fue de 1.1 en ranchos con presencia de perros. En Aguascalientes, se demostró que los perros también presentan anticuerpos contra *N. caninum*, y se observó una seroprevalencia general de 32 %; en perros que estaban en contacto con ganado la prevalencia fue de 41 %, mientras que en aquellos que habitaban en zonas urbanas fue de 20 %; además, el ganado que está en contacto con estos perros en los ranchos tiene mayor riesgo de infección (OR = 2.8; Cruz-Vázquez *et al.*, 2008).

Diversos estudios (Baszler *et al.*, 1999; Okeoma *et al.*, 2004; Medina *et al.*, 2006; Razmi *et al.*, 2007) han demostrado la presencia de *N. caninum* mediante la técnica de PCR utilizando tejidos frescos o embebidos en parafina y/o mediante la extracción del ADN directo de la sangre de bovinos. Con estas pruebas

moleculares se han determinado las infecciones activas en bovinos (Okeoma *et al.*, 2004). Por esta razón, en los casos en que las vacas fueron positivas a ELISA pero negativas por PCR, se puede asumir que la infección ya fue controlada por los mismos animales infectados, ya que la presencia de anticuerpos y la ausencia de ADN indican que el parásito ya no circula en la sangre y es posible que se encuentre enquistado en algún órgano del hospedero. Sin embargo, en los animales que fueron positivos por PCR y negativos a ELISA, se puede asumir que se trata de una primoinfección o de animales que cursan una infección persistente (Okeoma *et al.*, 2004). De las vacas seropositivas estudiadas todas tenían antecedentes de aborto, lo que sugiere que éste pudo haber sido causado por *N. caninum*; sin embargo, esto solamente puede ser comprobado hasta realizar la identificación de ADN en tejidos de los fetos abortados por esas vacas. De las tres muestras seropositivas por PCR una vaca fue positiva en ambas pruebas, lo que sugiere una infección activa o crónica, ya que la PCR amplificó ADN de *N. caninum*, lo que significa que la vaca cursaba una parasitemia.

Esto es contrario a lo observado en las tres vacas seronegativas a ELISA y que resultaron positivas por PCR, lo que sugiere una primoinfección, y que el sistema inmune no ha producido anticuerpos contra *N. caninum* que puedan ser detectados mediante la prueba de ELISA; en este caso se asume que el bovino ha estado en contacto con el parásito, y el hecho de identificar el ADN de *N. caninum* en la sangre significa que el protozoario circula en los bovinos del rancho o en el medio ambiente y además, podría tratarse de una transmisión vertical si se hubiera confirmado que la madre fuera positiva a *N. caninum*.

Por otra parte, en la vaca que resultó positiva a ambas pruebas se podría sospechar de una reinfección, lo cual podría sugerir que en ese rancho está ocurriendo transmisión horizontal (Bartels *et al.*, 2007), misma que podría ser la causante del aborto presentado con anterioridad por esta vaca. No obstante, para poder afirmar este hecho sería necesario amplificar el ADN del parásito en los tejidos de los fetos abortados (Medina *et al.*, 2006), para asegurar que los abortos fueron causados por *N. caninum*.

## CONCLUSIÓN

Se demostró que *N. caninum* está distribuida en todos los sistemas de producción bovina en la zona norte del estado de Veracruz. Los principales factores de riesgo asociados a la infección de *N. caninum* por tipo de

producción fue ganado lechero y ganado de doble propósito, así como la presencia de perros en la UP.

El diagnóstico por PCR anidado es útil para identificar infecciones activas, dada la amplificación de ADN del parásito en animales. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones utilizando métodos moleculares para determinar las verdaderas causas de la epidemiología de neosporosis con una mayor sensibilidad diagnóstica.

### AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Mixto Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) - Gobierno del Estado de Veracruz, por el financiamiento para el proyecto, con apoyo parcial del Proyecto 37066, Enfermedades Causantes de Abortos en Bovinos (Brucelosis, Leptospirosis, Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueitis Infecciosa, Neosporosis) del estado de Veracruz, Prevalencias y Factores de Riesgo Asociados, clave 37066.

### REFERENCIAS

- Antony, A., Williamson, N. B. 2003. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*. 51: 232-237.
- Barr, B. C., Anderson, M. L., Sverlow, K. W., Conrad, P. A. 1995. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Veterinary Record*. 137: 611-613.
- Barr, B. C., Conrad, P. A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M. L., Reynolds, J., Chauvet, A. E., Dubey, J. P., Ardans, A. A. 1993. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *Journal of American Veterinary Medical Association*. 202: 113-117.
- Bartels, C. J., Arnaiz-Seco, J. I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Bjorkman, C., Frossling, J., von, B. D., Conraths, F. J., Schares, G., van, M. C., Wouda, W., Ortega-Mora, L. M. 2006a. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Veterinary Parasitology*. 137: 17-27.
- Bartels, C. J., Huinink, I., Beiboer, M. L., van, S.G., Wouda, W., Dijkstra, T., Stegeman, A. 2007. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. *Veterinary Parasitology*. 148: 83-92.
- Bartels, C. J., van der Meulen, A. M., Dijkstra, T., Wouda, W. 2005. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Veterinary Parasitology*. 131: 235-246.
- Bartels, C. J., van, S. G., Veldhuisen, J. P., van den Borne, B. H., Wouda, W., Dijkstra, T. 2006b. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated abortion epidemics. *Preventive Veterinary Medicine*. 77: 186-198.
- Bartels, C. J., Wouda, W., Schukken, Y. H. 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology*. 52: 247-257.
- Baszler, T. V., Gay, L. J., Long, M. T., Mathison, B. A. 1999. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 4059-4064.
- Bergeron, N., Fecteau, G., Pare, J., Martineau, R., Villeneuve, A. 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Quebec. *Canadian Veterinary Journal*. 41: 464-467.
- Corbellini, L. G., Smith, D. R., Pescador, C. A., Schmitz, M., Correa, A., Steffen, D. J., Driemeier, D. 2006. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*. 74: 130-141.
- Cruz-Vazquez, C., Medina-Esparza, L., Marentes, A., Morales-Salinas, E., Garcia-Vazquez, Z. 2008. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* infection in dogs found in dairy farms and urban areas of Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 157: 139-143.

- Davison, H. C., Otter, A., Trees, A. J. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International Journal for Parasitology*. 29: 1683-1689.
- Dubey, J. P., 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology*. 41: 1-16.
- Dubey, J. P., Schares, G., Ortega-Mora, L. M. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Journal of Clinical Microbiology*. 20: 323-367.
- Dubey, J. P., Schares, G. 2011. Neosporosis in animals. The last five years. *Veterinary Parasitology*. 180 (1-2): 90-108
- Dyer, R. M., Jenkins, M. C., Kwok, O. C., Douglas, L. W., Dubey, J. P. 2000. Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Veterinary Parasitology*. 90: 171-181.
- Ellis, J. T., McMillan, D., Ryce, C., Payne, S., Atkinson, R., Harper, P. A. 1999. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *International Journal for Parasitology*. 29: 1589-1596.
- Garcia-Vazquez, Z., Cruz-Vazquez, C., Medina-Espinoza, L., Garcia-Tapia, D., Chavarria-Martinez, B. 2002. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 106: 115-120.
- Garcia-Vazquez, Z., Rosario-Cruz, R., Mejia-Estrada, F., Rodriguez-Vivas, I., Romero-Salas, D., Fernandez-Ruvalcaba, M., Cruz-Vazquez, C. 2009. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle in three southern states of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*. 41: 749-753.
- Garcia-Vazquez, Z., Rosario-Cruz, R., Ramos-Aragon, A., Cruz-Vazquez, C., Mapes-Sanchez, G. 2005. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Veterinary Parasitology*. 134: 61-65.
- Gondim, L. F., McAllister, M. M., Anderson-Sprecher, R. C., Bjorkman, C., Lock, T. F., Firkins, L. D., Gao, L., Fischer, W. R. 2004a. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *Journal of Parasitology*. 90: 1394-1400.
- Gondim, L. F., McAllister, M. M., Pitt, W. C., Zemlicka, D. E. 2004b. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. 34: 159-161.
- Hernandez, J., Risco, C., Donovan, A. 2001. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 219: 632-635.
- Hoar, B. R., Ribble, C. S., Spitzer, C. C., Spitzer, P. G., Janzen, E. D. 1996. Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with *Neospora* sp. infection. *Canadian Veterinary Journal*. 37: 364-366.
- Jensen, A. M., Bjorkman, C., Kjeldsen, A. M., Wedderkopp, A., Willadsen, C., Uggla, A., Lind, P. 1999. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 40: 151-163.
- Mainar-Jaime, R. C., Thurmond, M. C., Berzal-Herranz, B., Hietala, S. K., 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Veterinary Record*. 145: 72-75.
- McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A., McGuire, A. M. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. 28: 1473-1478.
- Medina, L., Cruz-Vazquez, C., Quezada, T., Morales, E., Garcia-Vazquez, Z. 2006. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 136: 187-191.

- Moore, D. P., Campero, C. M., Odeon, A. C., Chayer, R., Bianco, M. A. 2003. Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health.* 50: 304-308.
- Morales, E., Trigo, F. J., Ibarra, F., Puente, E., Santacruz, M. 2001a. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *Journal of Comparative Pathology.* 125: 58-63.
- Morales, E., Trigo, F. J., Ibarra, F., Puente, E., Santacruz, M. 2001b. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 13: 413-415.
- Okeoma, C. M., Williamson, N. B., Pomroy, W. E., Stowell, K. M., Gillespie, L. 2004. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. *Veterinary Parasitology.* 122: 307-315.
- Pare, J., Fecteau, G., Fortin, M., Marsolais, G. 1998. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 213: 1595-1598.
- Razmi, G. R., Maleki, M., Farzaneh, N., Talebkhan, G. M., Fallah, A. H. 2007. First report of *Neospora caninum*-associated bovine abortion in Mashhad area, Iran. *Parasitology Research.* 100: 755-757.
- Rinaldi, L., Fusco, G., Musella, V., Veneziano, V., Guarino, A., Taddei, R., Cringoli, G. 2005. *Neospora caninum* in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems. *Veterinary Parasitology.* 128: 219-230.
- Romero-Salas, D., Garcia-Vazquez, Z., Montiel-Palacios, F., Montiel-Peña, T., Aguilar-Dominguez, M., Medina-Esparza, L., Cruz-Vazquez, C. 2010. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle in Veracruz, Mexico. *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 10: 1445-1451.
- Sanderson, M. W., Gay, J. M., Baszler, T. V. 2000. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Veterinary Parasitology.* 90: 15-24.
- Schares, G., Barwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Kloss, D., Schroder, R., Labohm, R., Drager, K., Fasen, W., Hess, R. G., Conraths, F. J. 2004. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology.* 129: 301-309.
- Segura, C. J., Honhold, N. 2000. Métodos de muestreo para la producción y la salud animal. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. pp: 66-68.
- Serrano-Martinez, E., Collantes-Fernandez, E., Chavez-Velasquez, A., Rodriguez-Bertos, A., Casas-Astos, E., Risco-Castillo, V., Rosadio-Alcantara, R., Ortega-Mora, L. M. 2007. Evaluation of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) aborted foetuses from Peru. *Veterinary Parasitology.* 150: 39-45.
- Tennent-Brown, B. S., Pomroy, W. E., Reichel, M. P., Gray, P. L., Marshall, T. S., Moffat, P. A., Rogers, M., Driscoll, V. A., Reeve, O. F., Ridler, A. L., Ritaven, S. 2000. Prevalence of *Neospora* antibodies in beef cattle in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal.* 48: 149-150.
- von Blumröder, D., Schares, G., Norton, R., Williams, D. J., Esteban-Redondo, I., Wright, S., Bjorkman, C., Frossling, J., Risco-Castillo, V., Fernandez-Garcia, A., Ortega-Mora, L. M., Sager, H., Hemphill, A., van, M.C., Wouda, W., Conraths, F. J. 2004. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Veterinary Parasitology.* 120: 11-22.
- Waldner, C. L., Janzen, E. D., Ribble, C. S. 1998. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 213: 685-690.

Williams, D. J., McGarry, J., Guy, F., Barber, J.,  
Trees, A. J. 1997. Novel ELISA for detection

of Neospora-specific antibodies in cattle.  
Veterinary Record. 140: 328-331.

*Submitted February 14, 2011 – Accepted July 08, 2011*  
*Revised received October 02, 2011*