

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE
TAQUIZOITOS DE NEOSPORA CANINUM
DE FETOS ABORTADOS DE VACAS LECHERAS**

POR:

SANDRO GARCIA COUTIÑO

TESIS

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

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREON, COAHUILA

OCTUBRE 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE TAQUIZOITOS DE
NEOSPORA CANINUM
DE FETOS ABORTADOS DE VACAS LECHERAS**

POR:

SANDRO GARCIA COUTIÑO

ASESOR PRINCIPAL

MC FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES

TORREON, COAHUILA

OCTUBRE 2001

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION BIOLÓGICA DE
TAQUIZOITOS DE NEOSPORA CANINUM
DE FETOS ABORTADOS DE VACAS LECHERAS**

POR:

SANDRO GARCIA COUTIÑO

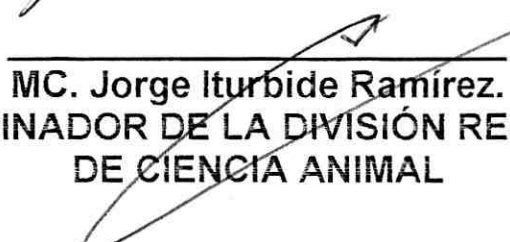
TESIS QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TITULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

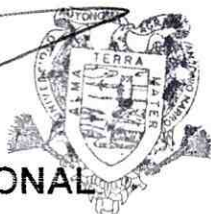
APROBADO POR



MC. Francisco Javier Carrillo Morales.
PRESIDENTE DE JURADO



MC. Jorge Iturbide Ramírez.
**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**



Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal
UAAAN - UL

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL





Mc. Francisco Javier Carrillo Morales
PRESIENTE DE JURADO.



M.V.Z. Abraham Gutiérrez Benitez
VOCAL.

M.C. José de Jesús Quezada Aguirre
VOCAL.



M.V.Z. José Luis Francisco Sandoval Elias
VOCAL SUPLENTE.

AGRADECIMIENTOS:

A DIOS: Todo poderoso por haberme permitido nacer, vivir y realizar mis estudios superiores y haberlos concluido, y poder haber realizado mi tesis profesional para ampliar más mis conocimientos a cerca de la medicina veterinaria zootecnista y poder presentar mi examen de titulación.

A MIS PADRES: Con mucho agradecimiento que con gran esfuerzo, amor y dedicación, me brindaron la confianza y la oportunidad de formar en mí un profesionista...los quiero mucho.

A MIS HERMANOS: Por todo el apoyo que me brindaron a cada paso de mis estudios.

A MI ALMA TERRA MATER: Por darme la oportunidad de formarme como profesionista.

A MIS TIOS Y PRIMOS: Por todos los buenos consejos.

A TODOS MIS CATEDRÁTICOS: Por toda la sabiduría que me transmitieron a través de sus clases y prácticas.

A TODOS MIS COMPAÑEROS: Por sus palabras de apoyo.

A MI ASESOR DE TESIS: M.C. Francisco Javier Carrillo Morales, por todo su apoyo y confianza incondicional para la realización de esta investigación. Espero de todo corazón que siga adelante, que formo parte de mi vida y que me ayudo cuando más necesitaba de una mano amiga, y espero que ayude a otros como lo hizo conmigo, por todo esto que Dios me lo proteja siempre.....lo quiero mucho.

A MIS ASESORES: Que gracias a su ayuda he logrado la culminación de este trabajo. ¡Muchas gracias!

M.C. Francisco Javier Carrillo Morales.

M.C. Jesús Quezada Aguirre.

M.V.Z. Abraham Gutiérrez Benítez.

M.V.Z. José Luis Francisco Sandoval Elías.

DEDICATORIAS:

Al señor Gustavo García Rincón y Señora Porfiria Coutiño Borrás, a quien agradezco desde el fondo de mi corazón, no sólo por el apoyo moral y económico, sino también por la vida que me dieron, por el amor y cariño que siempre me brindaron, ya que siempre estuvieron en los momentos más difíciles de mi vida. Le doy gracias a Dios por tenerlos a mi lado.....Gracias.

A mis hermanos:

Ingeniero Industrial en Producción

Gustavo J. García Coutiño.

Licenciado en Derecho

José Andrés García Coutiño.

Ingeniero Agrónomo en Horticultura

Danny Andy García Coutiño.

Con cariño, respeto, admiración, consejos, confianza, apoyo incondicional, moral y económico, lo único que me queda decirles es gracias por su constante ayuda y nunca se olviden, siempre estaremos juntos.

A mi cuñada y sobrino: Que son parte de nuestras vidas y gracias por compartir los momentos más felices con la familia.

A mis abuelos, tíos y primos: Por la constante preocupación que han demostrado por mi familia y el reflejo de su amor.

A todos mis familiares: Los cuales siempre han estado presentes en mi formación profesional.

A mis compañeros de estudio: Juan Carlos Zapata Ibarra y Alonso Espinoza Rodríguez, por todos los ratos de estudio y los buenos y malos momentos. Gracias.

Con respeto y admiración a **Luis H. Hernández Cabello**, Secretario de esta Universidad, por su apoyo incondicional brindado durante mi carrera y estancia en esta Institución..... Gracias.

Í N D I C E

Agradecimientos.....	i
Dedicatorias.....	ii
1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	2
2.1 Neosporosis.....	2
3.- Antecedentes.....	2
3.1 Algunos aspectos de la biología de Neospora Caninum.....	6
4.- Ciclo biológico.....	10
5.- Neosporosis del ganado.....	11
5.1. Prevalencia.....	11
6.- Impacto económico.....	12
7.- Epidemiología de la Neosporosis	13
8.- Patogenesis.....	16
9.- Objetivos.....	17
9.1. Objetivo general.....	17
9.2 Objetivo específico.....	17
10.- Materiales y métodos.....	18
10.1 Bioensayo de Neospora Caninum en ratones y cultivos celulares.....	19
10.2 Figuras 1 y 2.....	20
11.- Resultados y discusión.....	21
12.- Bibliografía.....	23

RESUMEN

N. Caninum es un parásito de Phylum apicomplexa, es causa de abortos en ganados lecheros y síndromes neurológicos en perros, y se encuentra distribuido en varios países del mundo.

N. caninum fue aislado del cerebro de fetos abortados de vacas de ganado lechero Holstein Friesham siguiendo los pasos de la técnica de Conrad.

Los parásitos aislados del cerebro fueron transferidos exitosamente en cultivos de células vero y en un segundo cultivo de células de endoteliales aórticas pulmonar de bovino.

El cultivo fue cryoconservado a -70°C para su uso y para posteriores estudios.

El perro ha sido reconocido como el huésped natural de *N. Caninum* de acuerdo con (McAllister et al 1998, Lindsay et al 1998 y Lindsay et al 1999).

Neospora caninum tiene predilección en fetos abortados y becerros neonatos por el cerebro y médula espinal de donde fueron aislados.

El aislamiento del parásito se logró obtener de animales infectados naturalmente debido a que en la comarca lagunera ningún grupo de investigación a podido aislar y reproducir experimentalmente la enfermedad.

En el cultivo se pudo observar su desarrollo con pases de renovación y medios de enriquecimiento cada 7 días.

Se proporciona información y método para el buen uso de la suplencia y renovación de taquizoitos de *N. Caninum*. para la ayuda de este y de estudios posteriores.

Este es el primer reporte de aislamiento de taquizoitos de *N. Caninum* en la Comarca Lagunera de fetos abortados de vacas lecheras infectadas en forma natural.

2-. INTRODUCCION

2.1. Neosporosis.

Es una enfermedad parasitaria producida por *Neospora caninum*, un protozoo perteneciente al Phylum apicomplexa, similar a *Toxoplasma gondii* pero diferente a este ultra estructural y antigénicamente, causando desórdenes neuromusculares, parálisis severa y muerte en perros y abortos y morbilidad neonatal en ganado bovino lechero y carne, ovejas, cabras, caballos, venados y en forma experimental se ha desarrollado en ratas, ratones, venados, gerbiles, ocasionando y desarrollando un cuadro clínico severo de parálisis (Dubey, J.P. Lindsay D.S. et al 1996).

3. Antecedentes.

Debido a la alta prevalencia en ganado, *N. Caninum* ha surgido como una importante causa de abortos en bovinos y otros animales, y ahora la Neosporosis se ha reconocido como una enfermedad económicamente importante y con un considerable impacto en la industria ganadera en varios países (Dubey J.P. 1996). Aunque reconocida solo recientemente, la Neosporosis ha emergido como una enfermedad económicamente importante desde que se le asoció por primera vez con un brote de abortos en 1987 en Nuevo México, USA a partir de esa fecha, ha habido reportes de abortos por *Neospora* en California y en casi toda la Unión Americana, en donde se ha confirmado a esta enfermedad como una fuente importante de abortos, particularmente en ganado lechero. La enfermedad está distribuida en casi todo el mundo. *Neospora caninum* fue aislado a una camada de cachorros, con problemas de desórdenes neurológicos por esas enfermedades y parálisis en Estados Unidos en 1988, por Dubey et al, sin embargo, este mismo parásito había sido encontrado por Bjerkas et al en 1984, en perros de Noruega, pero fue confundido por *Toxoplasma gondii*, estos dos investigadores Bjerkas y Dubey en 1991-92 compararon estructural y antigénicamente los parásitos encontrados de

perros de Noruega y Estados Unidos, previa preparación de un aislado de taquizoitos y un antisuero policlonal que fue usado en técnicas inmunohistoquímicas (IFAT) de secciones de tejidos fijados en formalina; y llegaron a la conclusión que ambos parásitos eran *N. Caninum*.

El cultivo de taquizoitos de *Neospora caninum* ha sido bien bioensayada en varios tipos de cultivos celulares con el objetivo primario de establecer nuevas líneas celulares. Esencialmente la misma técnica de cultivo y cuya presentación ha sido previamente descrita (Dubey, J.P. 1988).

La tasa de proliferación es diferente dependiendo del tipo de célula huésped que son usados para su cultivo. El mantenimiento extracelular de los taquizoitos de *Neospora caninum* en la presencia de un gran medio se pueden obtener resultados de 4 horas más rápidos pero se pierde rápidamente la infectividad (Hemphill, et al 1996).

En contraste con los resultados para los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* que se mantienen infectivos extracelularmente por más de 72 horas (Dubey et al., 1998b)

Los cultivos *in vitro* fueron y han sido empleados para ensayar la susceptibilidad de los taquizoitos de *N. Caninum* a más de 40 agentes quimioterapéuticos (Lindsay 1989, Lindsay DS 1997).

Además, estos sistemas de cultivos se han usado para investigar en más detalles el proceso con el que ocurre la adhesión y la invasión de *N. Caninum* a una célula huésped (Hemphill et al 1996).

Además, para producir manipulación genética del parásito usando y extrayendo su ADN para estudiar sus proteínas, sin duda también estas investigaciones son para estudiar la biología básica y la patología de la neosporosis,

con lo que puede ser el desarrollo de una gran herramienta genética molecular (Howe DK 1897, Beckers et al 1997).

Estos métodos indirectos incluyen: métodos bioquímicos para el diagnóstico y la demostración de anticuerpos en sangre.

Otros métodos directos como los inmunohistopatológicos e histopatológicos permiten la visualización del parásito o sus efectos patológicos.

También el cultivo in vitro ha sido desarrollado como una herramienta de diagnóstico para la detección de infecciones de *N. Caninum* y especialmente para discriminar la Neosporosis de las infecciones causadas por los similares parásitos a *N. Caninum*, como es el caso de *Toxoplasma gondii* y *Sarcocistis* especies.

El aislamiento in vitro del parásito y la detección del DNA del parásito por PCR (Dubey 1996, Hemphill 1998, Ellis 1998) son algunos de los que se pueden utilizar aprovechando los cultivos celulares sin menospreciar los ensayos serológicos con técnicas de ELISA directa o indirecta que resultan ser más importantes para la demostración del parásito y evaluar los riesgos de *N. Específica* (Bjorkman et al 1994, Packman et al 1998).

Por otra parte, antígenos recombinantes expresados bacteriamente han sido producidos para el uso para la producción del inmuno suero que se utiliza en el diagnóstico de Neosporosis bovina (Louie et al 1997, Lally et al 1996).

En términos de la identificación de las moléculas antigénicas de *Neospora* estas pueden muy bien usarse para el uso de la fabricación de vacunas y desarrollar respectivamente herramientas para futuras técnicas inmunodiagnósticos; la caracterización de las proteínas de los parásitos y sus glicoproteínas pueden tomar parte en la compleja relación entre el parásito y el huésped sin descartar que son de suma importancia.

En la relación huésped parásito es obvio que esta depende fuertemente de la reacción inmuno del huésped, con lo cual estos componentes del parásito provocan una acción directamente en el sistema inmuno del huésped.

Este proceso determina una infección autoctona y contribuye a la eliminación o sobrevivencia del parásito.

La interconversión entre 2 etapas durante la fase crónica de una infección por *Neopora caninum* parece ser restringida en ciertos tejidos pudiendo ser demostrado por la repetición de la transmisión vertical al fin de la primavera o bien asociado a un sero de conversión durante la preñez.

Esto de la inmunología de las infecciones de *N. Caninum*, necesita ser investigado y sus componentes antigénicos contribuyan a mejorar la respuesta humoral y la respuesta inmunocelular.

El nivel de interacción es más importante en los parásitos intracelulares, desde el reconocimiento de sus receptores de superficie de las células huésped, esto podría crucialmente establecer los mecanismos de invasión a la célula huésped.

Considerables trabajos han sido investigados para identificar y caracterizar las proteínas de los taquizoitos de *N. Caninum*, que forman una parte muy importante en el complejo de interacciones entre el parásito y el huésped. (Bjerkas and Dubey SP 1994).

3.1. Algunos aspectos de la biología de la *N. Caninum*.

La *Neospora caninum* es un parásito intracelular obligado y sus taquizoitos han sido detectados en una variedad de tejidos y tipos de células (*Dubey JP 1993, Dubey JP 1996*). Estas sugerencias de *N. Caninum* de exhibir solo una pequeña especificidad de células huésped es contradictorio porque es capaz de invadir un gran rango de células nucleares. (*Dubey et al 1996*.)

Los taquizoitos encerrados en sus vacuolas parasitaforas proliferan por endodiogenia, produciendo varios cientos de nuevos parásitos en pocos días. La proliferación de los taquizoitos forman una membrana y de esos quistes son reagrupados en una masa crítica que le produce una lisis a las células huésped y el relajamiento ocurre subsecuentemente al infectar células vecinas (*Hemphill A. 1999*).

En contraste, a la lenta división de los bradizoitos de *N. Caninum*, *Toxoplasma gondii* es capaz de formar quistes en los tejidos intracelularmente agrupados por una pared quística sólida.

Estos quistes pueden persistir infectando a células huésped por varios años sin causar ninguna manifestación clínica significativa (*Hemphill A. 1999*).

Los quistes de *N. Caninum* conteniendo bradizoitos han sido detectados exclusivamente en el sistema nervioso central (*Lindsay DS et al 1996*).

Conrad et al 1993, aislaron *N. Caninum* de fetos bovinos abortados y usando el primer aislado bovino, reprodujeron experimentalmente la muerte (*Barr BC 1994*) de un bovino por consiguiente, de esta manera, la infección trasplacentar podría ser taquizoitos el modo de transmisión de Neosporosis. Este proceso puede ocurrir repetidamente en el mismo animal (*Dubey JP et al 1998; Bjerkas et al., 1984; Barr et al., 1993*).

Sin embargo, la infección prenatal del feto no siempre conduce a la enfermedad y el parásito puede resistir silenciosamente a los tejidos en una forma normal clínicamente, la transmisión transplacentaria experimental ha sido inducida en otras especies entre las cuales: los perros (Cole, R.A. et al 1995), gatos (*Dubey J.P. 1989*) las ovejas (*McAllister et al 1996, Buxton et al 1998*), ganado (*Barr, B.C. 1994*), cabras (*Lindsay DS 1995*), ratones (*cole et al 1996, Long Mt Baszler 1996*) los cerdos (*Jensen L 1998*) y algunos primates no humanos (*Barr BC 1994*).

La inoculación de *N. Caninum* en becerros neonatos se puede producir añadiendo los parásitos al calostro revelándose una infección oral con taquizoitos por lo cual los calostros podrían ser una ruta adicional de transmisión vertical en becerros recién nacidos (*Uggla A. 1998*).

Mc Allister et al, han demostrado que los gatos no son los más ligados como posibles huéspedes definitivos, en *N. Caninum* (*Mc Allister et al 1998*), pero en los perros son el huésped definitivo de *N. Caninum* (*Mc Allister et al 1998*).

En términos del status filogenéticos, en *N. Caninum* es puesto normalmente dentro de la familia *Sacrocystidae* y es establecido en un grupo hermano de *Toxoplasma gondii* en el Phylum *apicomplexa* (*Ellis J. et al., 1994*). Recientemente *N. Caninum* era el solo miembro del género *Neospora*, sin embargo, *Marsh et al* aislaron un parásito apicomplejo de SNC de un equino adulto que fue ultraestructuralmente muy similar a *Neospora*.

Mostrando distintas diferencias de *Neospora caninum* de origen bovino y canino con respecto a sus proteínas inmunoreactivas y a sus 7 diferentes nucleótidos en la secuencia de su espacio de transcripción interna de su ADN (ITS).

Estas diferencias del parásito aislado pueden representar una nueva especie de *Neospora* y que fue nombrada *Neospora Hughesi* (*Marsh A.E. 1998*).

En fetos abortados y becerros neonatos, *N. Caninum* tiene predilección por el cerebro y médula espinal y han sido aislados del cerebro de fetos abortados y becerros recién nacidos (Conrad et al 1993; Yamane et al 1997; Davison et al 1999; Magnino et al 1999). Sin embargo, nunca ha sido aislado de tejido del ganado adulto.

Los taquizoitos son ovalados o en forma de media luna y miden de 3 a 7 por 1 a 5 micrómetros, dependiendo del estadio de división, éstos se dividen en 2 zooitos por endodiogenia. En animales infectados los taquizoitos se encuentran en macrófagos, polimorfonucleares, células neurales (axones, células de Schwann, neuronas, células endodiales, células de la retina y astrocitos) fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células epiteliales tubulares del riñón, hepatocitos y otras células del cuerpo. La célula infectada puede contener hasta 100 taquizoitos. Estos últimos se encuentran dentro del citoplasma de la célula huésped con o sin vacuola parasitófora (VP). Los taquizoitos de *N. Caninum* tienen organelos semejantes a los de *T. Gondii*, sin embargo, existen algunas diferencias. Los taquizoitos de *N. Caninum* tienen una membrana citoplásmica con tres capas, 22 microtúbulos, 2 anillos apicales, un conoide, un anillo polar de 1 a 3 mitocondrias, menos de 15^o micronemas 8 a 12 "rhoptries" (organelos apicales con forma de pera, se cree que están involucrados en la invasión de la célula del huésped por parte del parásito) anteriores al núcleo y de 4 a 6 "rhoptries" posteriores al núcleo, un complejo de Golgi, un retículo endoplásmico liso y un rugoso, un núcleo y un nucleolo. Los "rhoptries" contienen un material sólido electrodenso y son de 2 a 4 veces más gruesos que el diámetro de los micronemas. La discrepancia en el número de "rhoptries" contienen un material sólido electrodenso y son de 2 a 4 veces más gruesos que el diámetro de los micronemas. La discrepancia en el número de "rhoptries" encontrada como más de 30 por *Bjerkas y Presthus (1989)* y más de 18 por *Speer y Dubey (1989)* quizá se deba a la dificultad de distinguir "rhoptries" de los gránulos densos (10). Los microporos no se han visto en taquizoitos de animales, pero si se han encontrado en taquizoitos de cultivos celulares. *Bjerkas et al 1989*.

Los quistes con bradizoitos en los tejidos, son con frecuencia de redondos a ovales, de más de 107 micrometros de largo y se encuentran solo en el tejido nervioso (cerebro, médula espinal y retina). La pared de quiste es lisa y mide más de 4 micrometros de espesor, dependiendo del tiempo de infección. En muchos quistes tisulares la pared es de 1 a 2 micrometros de espesor. La pared del quiste contiene estructuras parecidas a tubulos, no hay septos y no existe pared quística secundaria (*Bjerkas, et al 1989*)

Los bradizoitos son delgados (de 6 a 8 por 1 a 1.3 micrometros) y contienen los mismos organelos que se encuentran en los taquizoitos con excepción de que existen menos "rhoptries" y éstos son más PAS-positivos. La pared de los quistes se tiñe en forma variable con PAS. Entre los bradizoitos existen estructuras tubulares vesiculares y pueden contener microporos (*Dubey and Bjerkas 1992.*)

Con la ayuda del microscopio óptico de transmisión se pudieron detectar las diferencias ultraestructurales entre los taquizoitos de *T. Gondii* y los de *N. Caninum*. Entre las principales diferencias se incluyen la estructura y el número de "rhoptries". Estos últimos son más numerosos en *N. Caninum* que en *T. Gondii*, su contenido es electrodenso en *N. Caninum* y electrotransparente en *T. Gondii*. La principal diferencia entre *N. Caninum* y *T. Gondii* en cuanto a los quistes es el espesor de la pared en los quistes de *N. Caninum*, esta mide de 1 a 4 micrometros y la de *T. Gondii* mide menos de 0.5 micrometros (*Dubey et al*).

4. Ciclo biológico *Neospora caninum*

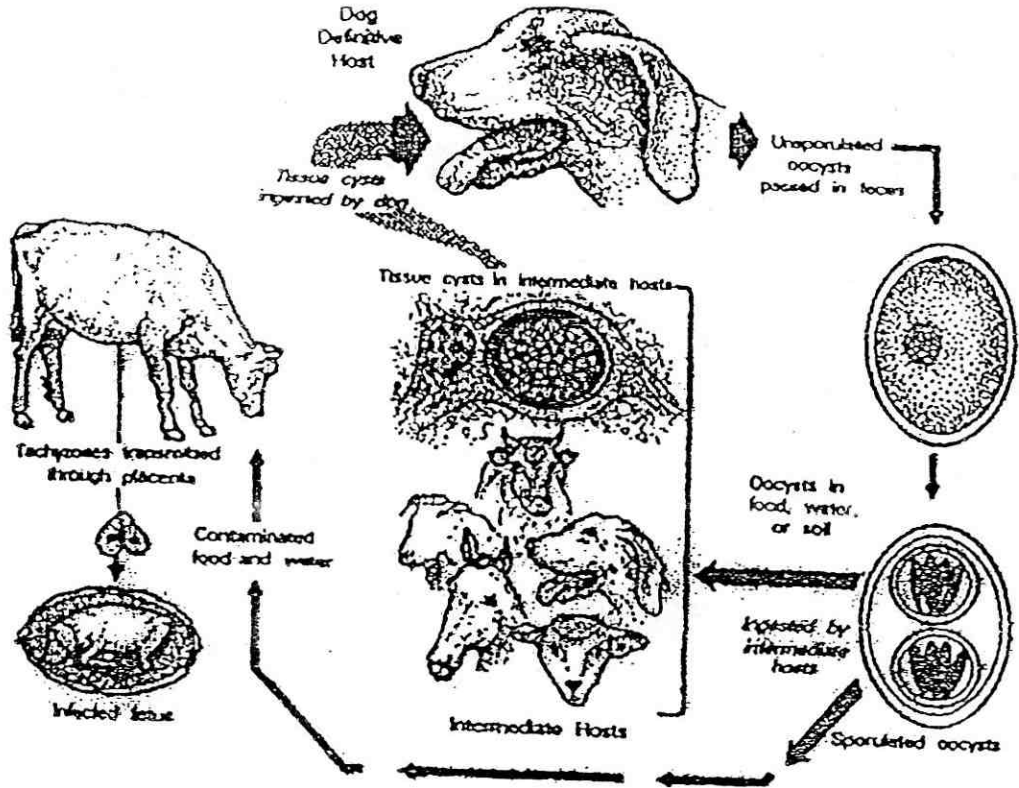


Fig. 1. Life cycle of *Neospora caninum*.

La biología natural del parásito fue hasta hace poco confirmada cuando los oocistos fueron encontrados en las heces de los perros (Mc Allister et al 1988^a), los perros pueden servir como huésped intermediario y definitivo. *N. Caninum* ha sido encontrado en tejidos de varios animales en ovejas (Dubey et al 1990), cabras (Dubey et al 1992), Barret et al 1992, y venados (Woods et al 1994; Dubey et al 1996a). Anticuerpos de *N. Caninum* fueron demostrados en sueros de búfalos, coyotes, zorro rojo, y camellos expuestos con agua natural, sugiriendo que estos huéspedes podrían ser huéspedes intermediarios de *Neospora caninum* (Lindsay et al 1996^a, Buxton et al 1997c, Simpson et al 1997; Dubey et al 1998c; Hitali et al,

Huong et al 1998), en gatos, ratones, cerdos, ratas, gerbiles, zorros y changos se han inducido como huéspedes intermediarios.

Los taquizoitos y los quistes son las etapas que se han encontrado en los hospederos intermediarios en forma intracelular, siendo los primeros 6 X 2 mm los quistes son redondos y ovales. De aproximadamente 107 μ g encontrándose en el sistema nervioso central, incluyendo la retina (*Dubey et al 1998^a, Dubey y Lindsay 1996*). La pared del quiste es de 4 μ m conteniendo los bradizoitos de 7 X 2 μ m poco se conoce lo concerniente al desarrollo y distribución en los tejidos de *N. Caninum* según sea su vía natural de infección y la ruta de transmisión.

5. NEOSPOROSIS EN GANADO

5.1. Prevalencia.

Neospora caninum afecta tanto al ganado lechero (*Dubey y Lindsay 1996*) como al ganado de carne (*Hoar et al 1996; Waldner et al 1998*). Es la mayor causa de abortos en ganado lechero en los Estados Unidos (*Anderson et al 1991, 1995*), Nueva Zelanda (*Thomton et al 1991*); y de Holanda (*Wooda, 1998*). Recientemente, infecciones por *N. Caninum* en bovinos han sido reportadas desde Argentina (*Campero et al 1998*); en Bélgica (*de Kruit et al 1997*); Canadá (*Duivenvoorden and Lusi, 1995; Paré et al (1998)* Denmark (*Agerholm et al 1997*); Alemania (*Conraths et al 1998*); Nueva Zelandia (*Reichel y Drake 1996 Cox et al 1998*); España (*Fondevilla et al 1998*; Suecia (*Stenlund et al 1997*) M Reino Unido (*Graham et al 1996; Buxton et al 1997^a; Davison et al 1997 M Otter 1997, Otter y Wilson 1997; Otter et al 1997, Caldow 1998; USA Estados Unidos (Dubey et al 1997, Thurmond et al 1997; Paré et al 1997; Hattel et al 1998; Zimbabwe (Jardine y Wolls 1995) Brasil Gondim L.F.P. et al 1999, basada en vigilancia serológica, Tailandia (Pongsatorn Suteera Parpa et al 1999), (Huong) Vietnam (Huong et al 1998) Tailandia (Kashiwazail et al 1998).*

En los primeros reportes de *Conrad; Anderson y Barr (1994)* California del 8 al 19% de todos los fetos bovinos enviados al laboratorio de diagnóstico, fueron diagnosticados por esta infección, y según la región geográfica el 42.5% de los abortos son atribuibles a Neosporosis (*Anderson et al 1991, 1995*).

6. IMPACTO ECONOMICO

El impacto económico depende de los costos indirectos del valor del feto perdido, dependiendo el grado de avance de la gestación, asistencia profesional, costos asociados al diagnóstico e inseminación artificial, semen, incremento del tiempo de lactación, baja de la producción láctea, costos de reemplazamiento de vacas abortadas (*Thurmond and Hiatala 1996b) 1997^a, b*) no hay datos confiables de las pérdidas económicas debido a la Neosporosis en la industria del ganado en cualquier parte del mundo, solo un dato confiable en California, en donde *Anderson et al 1991, 1995*) que del 20 al 43% de todos los abortos en bovinos y de 15 a 20% en Holanda (*Wouda, et al 1997*), son debido a Neospora. Las pérdidas económicas estimadas en California relacionadas con Neospora es en una cantidad aproximada de 35 millones de dólares por año, y de acuerdo a *Pare Thurmond et al 1997-1998*) un aborto de media gestación fue valorado en 600 a 1000 dólares solo en California de 1-2 millones de vacas lecheras aproximadamente 400,000 abortos podrían deberse a Neosporosis (*Dubey J.P. 1999*).

Y en Australia, las pérdidas por Neosporosis son estimadas en la industria lechera en 85 millones y en la industria del ganado de carne en 25 millones de dólares anuales (*Ellis 1997*). Sin embargo, estas cifras son estimadas lo que hace que se requiera un estudio científico urgente de la importancia económica de la Neosporosis bovina.

7. EPIDEMIOLOGIA DE LA NEOSPOROSIS

Neospora caninum es eficientemente transmitido en forma vertical en ganado por varias generaciones (*Bjorkman et al 1996; Anderson et al 1997; French et al 1998; Shares et al 1998*), pero en la transmisión horizontal parece ser necesario introducir nuevas infecciones en el ganado (*Pare et al 1996, 1997; Thurmond et al 1997; Wouda et al 1998c, French et al 1998; Shares et al 1998*). La transmisión horizontal de vaca a vaca no se ha demostrado, datos seroepidemiológicos soportan el rol del perro en el ciclo de *Neospora* (*Paré et al 1998; Sawada et al 1998; Wouda 1998*) al presente no se conoce la frecuencia de los oocistos de *N. Caninum* de los perros en la naturaleza ni la resistencia de los oocistos y el tiempo de resistencia en los alimentos. Pero solo es prudente como medida de control proteger los animales y el agua de la contaminación con heces de perros, para así evitar que los perros coman fetos abortados, membranas fetales (placentas) o becerros muertos. Al no existir una vacuna para prevenir los abortos inducidos por *Neospora* en ganado o de prevenir la contaminación con oocistos en heces de los perros, la prevención de la transmisión del parásito de la madre al feto, no ha sido bien demostrada, haciendo con esto una sugerencia impráctica en prevalencias altas en ganado (*Dubey, 1999*).

El ciclo biológico natural del parásito fue recientemente descubierto al ser encontrado los oocistos de *N. Caninum* en heces fecales de perros (*Mc Allister et al 1998^a*, los perros pueden servir como huésped intermediario y huésped definitivo.

Además, de los perros ganado lechero y de carne y caballos, *N. Caninum* ha sido encontrado en tejidos de ovejas (*Dubey et al 1990*), cabras (*Dubey et al 1992*) *Barr et al 1992* y ciervos (*Woods et al 1994; Dubey et al 1996*).

Anticuerpos de *Neospora* fueron demostrados en sueros de búfalos, coyotes, zorros rojos y camellos, sugiriendo que estos huéspedes son huéspedes intermediarios naturales de *N. Caninum* (*Lindsay et al 1996^a, Buxton et al 1997c; Simpson et al 1997; Dubey et al 1998c, Hilali et al 1998; Houg, et al 1998*) gatos,

ratones, cerdos, ratas, gerbos, zorros y monos han sido experimentalmente inducidos a la infección por *N. Caninum*. Los taquizoitos y los quistes han sido las etapas encontradas en los huéspedes intermediarios en una forma intracelular.

Los taquizoitos de *Neospora caninum* son aproximadamente de 6 X 2 μ m los quistes son redondos y ovales en Capítulo 1, a 107 milimicras (μ m) de largo. Se han encontrado en el sistema nervioso central incluyendo la retina (*Dubey et al 1998^a*).

Dubey et al 1996, la pared del quiste es aproximadamente de 4 (μ m milimicras) y los bradyzoitos son de 7 X 2 μ m. Quistes también han sido encontrados en los nervios periféricos del caballo (*Daft et al 1996*) y en el músculo ocular infectado congénitamente (*Lindsay et al 1996b*).

Poco se conoce en lo concerniente al desarrollo y distribución de *Neospora caninum* en los tejidos de los animales infectados por vía natural y sin rutas de transmisión, sin embargo, los quistes han sido encontrados en el cerebro de ratones inoculados por vía parenteral a los 17 días post inoculación (*McGuire et al 1997b*). Con un diámetro 30 μ m de diámetro y de 107 μ m milimicras) (*McGuire et al 1997b*). Los cuales fueron separados del cerebro, usando un homogenado de ficoll gradiente (*McAllister et al 1997^a*).

Caninum de *Neospora* ha sido bien demostrado en cerebro fetal bovino a los 31 días post inoculación con taquizoitos (*Dubey et al 1992; Barr et al 1994b*).

Poco se sabe de la infectividad oral de los quistes en los tejidos y taquizoitos por la ingestión oral, sin embargo, *McAllister et al (1998^a)* reporta que quistes de tejido infectados oral experimentalmente en ratones fueron no infectivos en gatos.

Quistes sin esporular han sido encontrados en heces de perros derivados de una forma infectiva experimental. *McAllister et al 1998^a, Lindsay et al 1999*.

Los oocistos esporulados contienen 2 esporocistos cada uno con 4 esporozoitos. Los oocistos de *Neospora caninum* son de 10-11 μ m (milimicras) de diámetro y son morfológicamente indistinguibles de *Hammondia heydorni* encontrados en heces felinas y de *Toxoplasma gondii* y *Hammondia hammondi* en heces de gatos *McAllister et al 1998^a*. Según *McAllister* cuando se han encontrado oocistos en forma baja 1 de 3 perros han resultado seronegativos y no se convierten a *Neospora caninum*.

Los oocistos de *Neospora caninum* no son muy infectivos en ratones ni inducen inmunosupresión (*J.P. Dubey* sin publicar) hasta el momento diciembre 1999. Poco se conoce de la sobrevivencia y frecuencia de los oocistos en heces de perro en el medio ambiente y de otros perros domésticos que son también huéspedes para *Neospora caninum*.

Huéspedes susceptibles pueden ser infectados por ingestión de alimentos y bebidas contaminadas con oocistos de *N. Caninum* de heces fecales de perro, sin embargo, esto solo se ha podido hacer en ratones de laboratorio en forma experimental (*Mc Allister et al 1998b*).

En una forma experimental se han infectado lactogénicamente (*Cole et al 1999^a*). Algunos becerros fueron infectados oralmente con taquizoitos agregados a la leche (*Uggla et al 1998*). *Neospora caninum* es transmitido de madre a feto en ganado (*Dubey et al 1992; Barr et al 1994b*) ovejas (*Dubey y Lindsay 1990; McAllister et al 1996b; Buxton et al 1997b; 1998*) cabras (*Lindsay et al 1995b*) ratones *Cole et al 1995^a, Long y Baszler 1998; Liddell et al 1999*, perros *Dubey y Lindsay 1989b; Cole et al 1995b*; gatos (*Dubey y Lindsay 1989^a*) monos (*Barret et al 1994^a*) y cerdos (*Jensen et al 1998*).

Hasta el presente no son satisfactorios los modelos de estudio de la patogénesis en pequeños animales con infecciones de *N. Caninum* porque ha resultado que *N. Caninum* no es muy infectiva para ratones suizos *Weshter* en donde

los quistes en los tejidos se desarrollan ocasionalmente (*Dubey et al 1998b*). Sin embargo, en ratones BALB/c son más susceptibles para el parásito (*Lindsay et al 1996^a*) con cepas de ratones C57BL/6 y BALB/c aparentemente son más susceptibles que B10.02 Long et al (1998).

Con la disponibilidad de ratones con defectos inmunológicos genéticamente es más ventajoso para el estudio de la inmunidad en infecciones con *N. Caninum* (*Dubey and Lindsay, 1996; Sawada et al 1997*).

Los mecanismos de infección primaria y la transmisión congénital repetida son desconocidos. El tiempo de las infecciones congénitas repetidas ocurren en perros y en el ganado debido a una relajación de la infección primaria o de la reinfección pero aún siguen siendo nada claras.

8. PATOGENESIS

La Neosporosis en el ganado se asocia con parálisis neonatal encefalomielitis y aborto entre el tercero y noveno meses de gestación, ocurre en mayor frecuencia entre los meses quinto y sexto. No se encuentran lesiones macroscópicas características en fetos, placenta ni en neonatos y generalmente no existe retención placentaria Otter y Jeffrey en 1997, notificaron en un becerro de 5 días de nacido, incapacidad para ponerse de pié, a la necropsia presentaba despigmentación bilateral especialmente de la sustancia gris del cerebro (*Anderson et al 1990*). La momificación de fetos ha sido un hallazgo clínico patológico importante; sin embargo, ha sido difícil determinar la causa de esta momificación, ya que los tejidos se encuentran muy autolizados en el estudio histopatológico (*Dubey J.P. 1992*). El parásito afecta principalmente al SNC, miocardio y músculo esquelético. Otros órganos afectados comúnmente son el hígado y el pulmón. Los órganos afectados

con menor frecuencia son la piel, nódulos linfáticos, bazo, ojos y glándulas adrenales. En virtud de que *Neospora* constituye un patógeno intracelular, puede matar rápidamente las células del huésped como consecuencia de multiplicación activa de taquizoitos pues produce necrosis, inflamación no supurativa y granulomas en los tejidos afectados. Los quistes con bradizoitos tisulares con frecuencia no se rodean de reacción inflamatoria. La formación de granulomas alrededor de los quistes tisulares degenerados sugiere la ruptura de algún quiste y la subsecuente reacción inflamatoria por parte del huésped. El tiempo que permanecen los quistes en el SNC aún no se conoce.

9. OBJETIVOS.

9.1 Objetivo General:

- Realizar un muestreo de tejidos de fetos abortados de vacas lecheras seropositivas a *Neospora caninum* para su aislamiento.

9.2 Objetivos Específicos:

- Aislamiento de *Neospora caninum* en fetos abortados de vacas serológicamente positiva a *Neospora caninum* con técnicas inmunoenzimáticas e inmunohistoquímicamente (ELISA y Peroxidasa).

10. MATERIALES Y METODOS

10.1. Bioensayo de *Neospora caninum* en ratones y cultivos celulares.

Para la realización de esta investigación, se obtuvieron fetos de vacas abortadas de establos lecheros de la Comarca Lagunera con antecedentes de aborto y positivas serológicamente a *Neospora caninum*, los fetos fueron necropsiados asépticamente y se tomaron muestras de varios órganos entre ellos los más importante fue el cerebro y la médula espinal. anteriormente se realizó un análisis serológico con técnica de ELISA de *Neospora Caninum* en 5 establos de vacas lecheras de la Comarca Lagunera con antecedentes de aborto. según protocolo de Kit comercial Herd Check . Tesis de Licenciatura de la U.A.A.N.-U.L. (Cal y Mayor and Carrillo, M. 1998).

El cerebro de los fetos fue removido asépticamente y en pequeños trozos de tejido cerebral, fueron homogeneizados en solución salina estéril conteniendo antibióticos, se inocularon intraperitonealmente a 3 ratones, siguiendo la técnica descrita por (Sawada et al 1997).

Se realizó la necropsia en los ratones a los 46 días post-inoculación, porque estos presentaron emaciación y desarrollaron parálisis.

El homogenizado cerebral de los ratones fue preparado e inoculado en los medios de cultivos, siguiendo el método según (Yamane et al 1998).

Los taquizoitos de *Neospora caninum* previamente recuperados de un feto bovino abortado, fueron puestos in vitro con varios pases

Los taquizoitos fueron mantenidos y propagados en medio de cultivo pulmonary artery endothelial cells bovine donado por el DR Dubey del Departamento de Agricultura de USA, Agricultural Research Service, livestock and Poultry Sciences

Institute, Zoonotic Diseases Laboratory . Beltsville, Maryland 20705 con varios pases y fue mantenido en un medio mínimo esencial, suero fetal bovino, penicilina, estreptomycin, anfotericina B y con pases a 7 días de intervalo.

Los frascos fueron incubados con aproximadamente 7.5×10^9 de taquizoitos. Los cultivos celulares fueron suplementados con Dulbecco's minimum essential medium plus 10% y suero de caballo inactivado por calor, y 50 mg de sulfato de estreptomycin (DMEM-HS) al tiempo de la infección y a las 18-24 horas después de la inoculación el cultivo de taquizoitos fueron incubados a 37°C con 5% Co, cuando el 80 al 90% de las células eran infectadas y lisadas. Los taquizoitos fueron pasados a un nuevo medio y nueva capa de células a infectar; para esto fue evaluado diariamente al microscopio invertido a 100 X a 200 X. Los taquizoitos nuevamente fueron recolectados cuando el 80% de las células fueron infectadas y lisadas en el medio, el filtrado de taquizoitos fue lavado en una solución estéril de fosfato bufferado PBS PH 7.2 los taquizoitos fueron separados por centrifugación a 400 Xg por 10 minutos y resuspendidos en PBS estéril. La concentración de los taquizoitos fueron estimados usando el hemacitometro y el microscopio invertido.

La suspensión fue centrifugada una vez más a 400 xg por 10 minutos y el centrifugado final fue resuspendido en 500 ml (microlitros de PBS estéril).

La suspensión de taquizoitos fue almacenado a congelación en viales de vidrio y polietileno a 70°C.

Técnica según Conrad P.A. 1993, el número de taquizoitos en las células huésped infectadas aumentó entre el segundo y quinto día post inoculación y el efecto citopático observando en el medio de cultivo celular fue visto primeramente a los 3 días post inoculación (PI) consistente en rupturas en forma de agujeros en el medio celular. De acuerdo al método de cultivo por Conrad 1993.

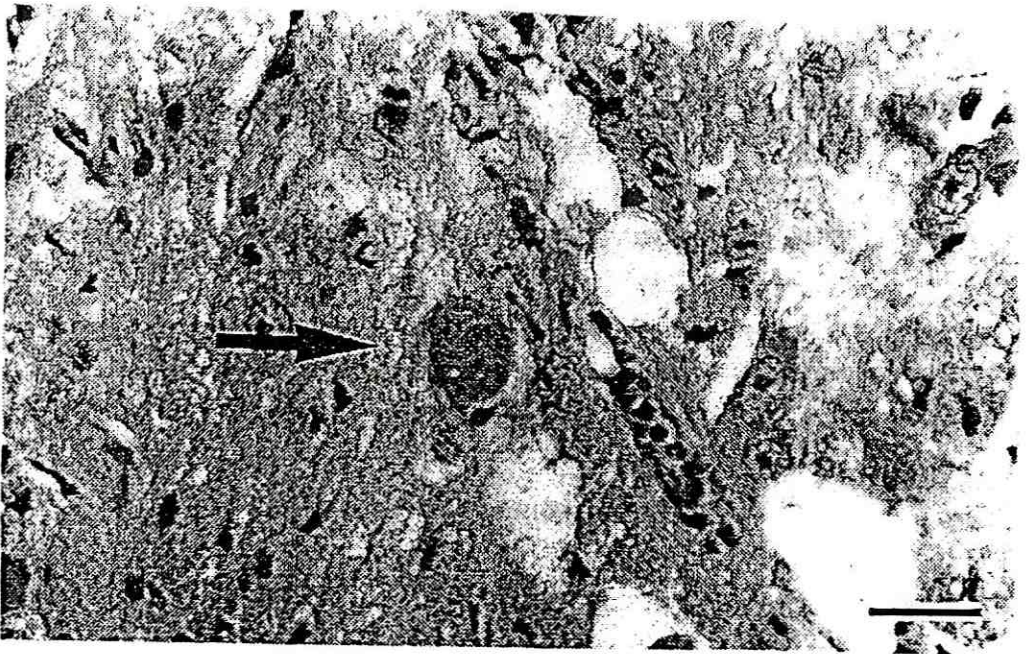


Figura No. 1. Taquizoitos de *Neospora Caninum* en cerebro de ratones infectados.

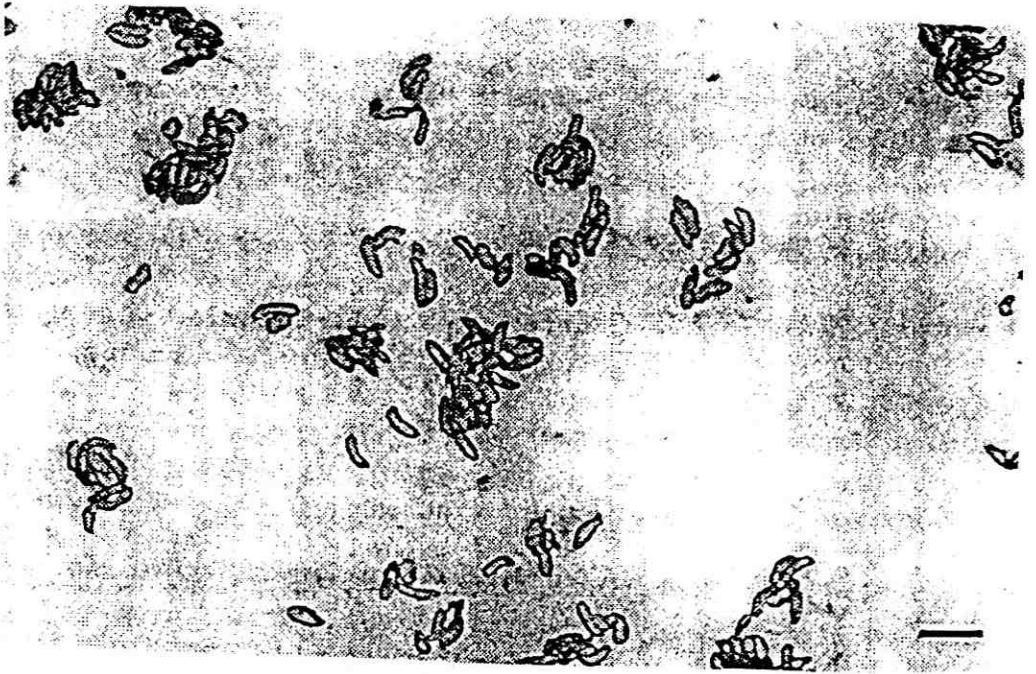


Figura No. 2 Aislado de Taquizoitos de *Neospora Caninum*

11.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los frascos del cultivo fueron examinados diariamente al microscopio y laminillas con muestras de cultivo fijadas en metanol y teñidas con Giemsa fueron examinadas en varios tiempos post-inoculación, el desarrollo inicial en el cultivo celular fue similar entre las 6 y 12 horas P.I. post inoculación, los taquizoitos intracelulares fueron vistos, en las células infectada entre las 6 y las 12 horas P.I.

Al primer día P.I. el proceso de endodiogenia ocurrió en las células con 1 a 4 taquizoitos presentes.

Posteriormente, aparecieron células hijas pares, estas etapas de la célula fueron vistas localizadas cerca del núcleo de la célula huésped. A las 36 horas P.I. fueron vistos células con grupos de taquizoitos de 10 en grupos de 4 y algunos pares de células hijas. El número de taquizoitos aumentó entre el 2 y 5º día P.I. en donde algunas células tenían más de 100 taquizoitos alargados.

Aproximadamente el 70% de las células del cultivo fueron destruidas entre el 4-6 día por lo que se recomienda hacer pasajes nuevos cada 7 días.

El tamaño aproximado fue de 71.0 por 28.3 milimicras con un promedio de 50.0 y 105.5 X 18.0 – 40.00 milimicras.

El presente estudio demuestra que el desarrollo de *N. Caninum* en cultivos celulares es por endodiogenia.

El número de taquizoitos en las células huésped infectadas aumentó entre el segundo y quinto día post inoculación y el efecto citopático observando en el medio de cultivo celular fue visto previamente a los tres días post inoculación (PI) consiste en rupturas en formas de agujeros en el medio celular. Se corrobora con la técnica según (*Conrad P.A. 1993*),

Esto es similar a lo que ocurre para: *Hammondia*, *Hammondi* y *H. Herdoyni*. *Sheffield F.A. et al 1976*, *Speer et al 1988*. Varias especies de *Neospora* (*Farer, 1972; Faller et al 1985, Faller and Thompson, 1974, Faller et al 1984. Lindsay and (Blogburn 1987)* and *toxoplasma gondii Sheffield and Melton 1968*. De estas especies, todas se desarrollan por endodiogenia en cultivos celulares.

Nuestro estudio provee información y método de cómo puede ser usado para obtener un constante, supleencias de taquizoitos de *N. Caninum* y para la ayuda de este y otros estudios, como puede ser el estudio de varias sustancias quimioterapéuticas, para establecer una terapia adecuada y a menor costo.

La correlación de los parásitos con otras lesiones viscerales de la vaca, incluyeron miositis focal en el corazón y músculo esquelético se pudo observar agregados de células mononucleares en el hígado y riñón estos resultados sugieren que el cerebro es uno de los posibles sitios de residencia latente de el parásito en infección, pero en vacas clínicamente normales, el cerebro pudiera ser uno de los organos donde se reactivan los taquizoitos para entrar al torrente sanguíneo e infectar el desarrollo del feto. Uno de los factores que inician la reactivación del parásito pudiera ser la preñez pero el mecanismo preciso resta por ser determinado. *Sawada et al 2000*.

Varias cepas de *N. Caninum* de bovino han sido aisladas de fetos abortados y becerros recién nacidos (*Conrad et al, Yamane et al 1997; Davison et al 1999; Magnino et al, 1999, Sawada M. et al 2000*), pero este es el primer reporte del aislamiento de *N. Caninum* de fetos abortados de vacas lecheras infectadas en forma natural en la Comarca Lagunera.

El aislamiento de los parásitos del cerebro de los fetos abortados y las lesiones que se observaron en exámenes histopatológicos previos sugiere que existe la compatibilidad con infecciones causadas por *N. Caninum* fueron en conclusión en este estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Agerholm, J.S. Willadsen, C.M., Nielsen, T.K., Giese, S.B., Holm, E. Jagger, J.F. 1997. Diagnostic studies of abortion in Danish dairy herds, *J. Vet. Med.Assoc.* 44, 551-558.
2. Anderson M.L. Blanchard P.C. Barr, B.C. Dubey, J.P. Hoffman, R.L., Conrad, P.A. 1991. Neospora like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198, 241-244.
3. Anderson, M.L., Reynolds, J.P., Rowe, J.D., Sverlow, K.W., Packham, A.D., Barr, B.C., 1997. Conrad, P.A., Evidence of Vertical Transmission of Neospora *J. AM. Vet. Med. Assoc.* 210 1169-1172.
4. Anderson, M.L. Palmer, C.W. Thurmond MC, Picanso J.P. Blanchard, P.C. Breitmeyer, R.E., Layton A.W. McAllister, M. Daft, B. Kinde, H. Read, D.H., Dubey, J.P. Conrad, P.A. Barr, B.C. 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 1206-1210.
5. Barr, B.C. Conrad, P.A. Syerlow, K.W. Taranta, A.f., Hendrickx, A.G., 1994. Experimental fetal and transplacental Neospora infection in the nonhuman primate. *Lab. Invest.* 71, 236-242.
6. Barr, B.C. Rowe, J.D., Syerlow, K.W., BonDurant, r.H., Ardans, A.A. Oliver, M.N. Conrad, P.A., 1994b. Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolate. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6,207-215.
7. Barr, B.C., Anderson, M.L., Woods, LM., Dubey, J.P., Conrad, P.A., 1992. Neospora -Like Protozoal Infections Associated With Abortion in Goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 265-367.
8. Barr, B.C. Conrad P.A. Briertmeyer R. Et al. Congenital Neospora infection in calves born from cows that had previously aborted Neospora-infected fetuses, four cases *J.A. Vet. Med. Assoc.* 1993: 202:113-7.

9. Bjerkas I. And presthus, J., 1989. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cary-forming sporozoan in dogs. *Acta pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 97: 459-468.
10. Beckers, C.J.M., Wakefield, T., Joiner, K.A., 1997. The expression of *Toxoplasma* proteins in *Neospora caninum* and the identification of a gene encoding a novel rhoptry protein. *Mol. Biochem. Parasitol.* 89-209-223.
11. Bjerkas, I., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 1994. Identified and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1, 1214-22 1.
12. Bjerkas, I., Mohn, S.F. Presthus, J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70, 271-274.
13. Bjorkman, C. Lunden A., Holmdahi, J. Barber, J. Trees, A.J., Uggla A. 1996. *Neospora caninum* vertical transmission herd generation *J. Parasitol* 187, 238-240.
14. Buxton D. Caldow, G.L. Maley S.W., Marks, J. Innes, E.A., 1997a, Neosporosis and bovine abortion in Scotland *Vet. Rec.* 141, 649-65 1.
15. Buxton D. Malcy S.W., Wright S., Thomson, K.M., Rac. A.G., Innes, E.A. 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep *J. Com. Pathol.* 118, 267-279.
16. Buxton D. Maley, S.W. Pastoret, P.P. Brochier, B., Innes, E.A., 1997 c. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* *Vet. Rec.* 141, 308-309.
17. Buxton, D. Maley, S.W. Thomson K.M. Trees A.J., Innes, E.A., 1997b, Experimental infection of non-pregnant and pregnant sheep with *Neospora caninum* *J. Comp. Pathol.* 1, 17, 1-16.
18. Cal y Mayor and Carrillo, M. 1998. Diagnóstico inmunoenzimático (ELISA) de *Neospora caninum* en 5 establos de vacas lecheras de la comarca lagunera , Tesis de licenciatura de la UAAAN-UL
19. Caldow, G.L., 1998. Bovine abortion outbreak associated with *Neospora* and other infectious agents. *Vet. Rec.* 142, 118-119.

20. Campero, C.M., Anderson, M.L. conocido, O., Odriozola, H., Bretschneider, O., Poso M.A. 1998. *Neospora caninum* associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet. Rec.* 142-228-229.
21. Cole, R.A., Lindsay, D.S., Biagburn B.L., Dubey, J.P., 1995a. Vertical transmission of *Neospora caninum* in mice. *J. Parasitol.* 81-730-732.
22. Cole, R.A. Lindsay D.S. Biagburn B.L., Sodonon D.C. Dubey, J.P. 1995b Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J. Parasitol.* 81-208-211.
23. Conrad, P.A. Barr, B.C., Syerlow, K.W., Anderson, M. Daft, B., Kinde, H., Dubey, J.P. Munson L., Ardans, A. 1993a, in vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp from aborted bovine fetuses. *Parasitol.* 106, 239-249.
24. Conraths, F.J., Bauer, C. Becker W., 1998. Nachweis von Antikörpern gegen *Neospora caninum* bei Kühen in hessischen Betrieben mit Abort- und Fruchtbarkeitsproblemen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 103-221-224.
25. Cox, B.T., Reichel, M.P. Griffiths, L.M., 1998. Serology of a *Neospora* abortion outbreak on a dairy farm in New Zealand: a case study. *New Zealand Vet. J.* 46, 28-31.
26. Daft, B.M., Barr, B.C., Collins, N. Syerlow K. 1996. *Neospora encephalomyelitis* and polyradiculoneuritis in an aged mare with Cushing's disease. *equine vet. J.* 28-240-243.
27. Davison, H.C., Trees A.J., Guy, F., Otter A. Holt J.J., Simpson, V.R., Jeffrey, M. 1997. Isolation of bovine *Neospora* in Britain. *Vet. Rec.* 141, 607.
28. Davison, H.C., Guy, F., Trees, A.J., Ryce., Ellis, J.T., Otter, A., Jeffrey, M., Simson, V.R., Holt, J.J., 1999. In vitro isolation of *neospora caninum* from a stillborn calf in the UK. *Res. Vet. Sci.* 67-103-105.
29. Dubey, J.P., Neosporosis. *Parasitol today* 1993, 9:452-8.
30. Dubey, J.P., Jenking, M.C., Adams, D.S., McAllister M.M., Anderson, Sprecher, R. Baszler, T.V. Kwok, O.C.H., Lally, N.C., Uggla, A., 1997. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis. *J. Parasitol* 83, 1063-1069.
31. De Kruif, A., Opsomer, G. De Meulemeester, L. 1997. Abortion on a Belgian dairy farm due to *Neospora caninum*. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 66, 179-182.

32. Dubey, J.P., Dorough K.R., Jenkins M.C., Liddell, S., Speer, C.A., Kwok, O.C.H., Shen, S.K. 1998b, Canine neosporosis clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of neospora caninum in mice and cell culture. *Int. J. Parasitol.* 28, 1293-1304.
33. Dubey, J.P., Abbitt, B., Topper, M.J., Edwards J.F. 1998a Hydrocephalus associated with Neospora caninum infection in a aborted bovine foetus. *J. Comp. Pathol.* 118, 169-172.
34. Dubey J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988b. Neonatal Neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 193- 1259-1263.
35. Dubey, J.P. Lindsay, D.S. 1989a. Transplacental Neospora caninum infection in cats. *J. Parasitol.* 75- 765-771.
36. Dubey, J.P. Lindsay, D.S., 1989b. Transplacental Neospora caninum infection in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1578-1579.
37. Dubey, J.P. Lindsay, D.S., 1990, Neospora caninum induced abortion in sheep *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 230-233.
38. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1996. A review of neospora caninum and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1-59.
39. Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Adams, D.S., Gay, J.M., Braszler, T.V., Blagburn, B.L., Thuilliez, P. 1996a. Serologic responses of cattle and other animals infected with Neospora caninum *Am. J. Vet. Res.* 57, 329-336.
40. Dubey J.P. Lindsay, D.S. Anderson, M.L. Davis, S.W., Shen, S.K., 1992, Induced transplacental transmission of neospora caninum in cattle, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 201, 709-713.
41. Dubey, J.P., Porterfield, M.L., 1990. Neospora caninum (Apicomplexa) in an aborted equine fetus *J. Parasitol.* 76, 732-734.
42. Dubey, J.P. Rigoulet, J. Lagourette, P. George C. Longeari, L. LeNet, J.L. 1996h. Fatal transplacental neosporosis in a deer (*Cervus eldi siamensis*) *J. Parasitol.* 82, 338-339.

43. Dubey, J.P. Romand S. Hilajj, M. Kwok, O.C.H., Thulliez, P. 1998c. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Egypt Int. J. Parasitol. 28:527-529.
44. Dubey, J.P. romand, S. Thulliez, P., Kwok, O.C.H. Shen S.K., Gamble-H.R. 1999. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in horses in North America J. Parasitol. Submitted for publication.
45. Duivenvoorden J. Lusi, P. 1995. *Neospora* abortions in eastern Ontario dairy herds Can. Vet. J. 36, 623.
46. Ellis, J.T., 1998. Polymerase chain reaction approaches for the detection of *neosporea caninum* and *toxoplasma gondii*. Int. J. Parasitol. 28,1053-1060.
47. Ellis, J.T., 1997. *Neospora caninum*: prospects for diagnosis and control using molecular methods. In:
48. Ellis, J. Luton, K., Bavers tock, P.R., Brindley, P.J., Nimmo , K.A., Johnson, AM., The phylogeny of *neosporea caninum*. Mol. Biochem parasitol 1994. 64: 303-11.. Fayer and D.E. Thompson. 1974- *Isospora felis* development in cultured cell with some cytological observations. Journal of parasitology 60: 160-168.
49. Fondevilla, D. Añor, S. Pumarola M. Dubey, J.P. 1998. *neosporea caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. Vet. Parasitol. 77, 187-189.
50. French N.P. Davison, H.C., Ciancy D., Begon M. Trees, A.J., 1998. Modelfing of *neosporea* species infection in dairy cattle: the importance of horizontal and vertical transmissiion and differential culting. Society fo Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, Proceedings of Meeting at the West County Hotel, Ennis, Co, Ciarc. 25-27 March 1998, pp 313- 12 1.
51. Fayer, R. 1972. cultivation of feline *isosporea rivolta* en mammalian cells. Journal of Parasitology 58:1207-1208.
52. Fayer, H.R. Gamble, and J.V. Ernest 1984. *Isosporea Suis*: Development in Cultured cells with some cytological observations. Proceedings of the Helminthological society of Washington 51:154-159.
53. Fayer, and J.L. Marht 1972. Development of *isosporea canis* (Protozoa: sporozoa) in cell cultures Zeitschrift for parasitenkunde 38:313-160-168.

54. Graham, d.A., Smyth, J.A., McLaren, I.E., Ellis, W.A., 1996, Stillbirth/Perinatal weak califsyndromo: serological examination for evidence of neospora caninum infection Vet. Rec. 139- 523-524.
55. Hattel, A.L., Castro M.D. Gummo, J.D., Weinstock D., Reed, J.A., Dubey, J.P. 1998. Neosporosis associated bovine abortion in Pennsylvania. Vet. Parasitol. 74-307-313.
56. Ho, M.S.Y., Barr, B.C., Marsh, A.E., Anderson, M.L. Rowe J.D., Tarantaj, A.F. Hendrickx, A.G. Syerlow, K. Dubey, J.P. Conrad, P.A., 1996, Identification of bovine Neospora parasites by PCR amplification and specific small subunit rRNA sequence probe hydrization. J. Clin. Micriobio. 34-1203-1208.
57. Hemphill, A., Gottstein, B., Kaufmann, H., Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by neospora caninum. Parasitol 1996, 112:183-97.
58. Hemphill A. The host-parasite relationship in neosporosis. Adv. Parasitol 1999, 43, 43-104.
59. Hilali, M., Romand, D., Thulliez, P., Kwok, O.C.H., Dubey, J.P., 1998. From camels from Egypt. Vet. Parasitol 75, 269-271.
60. 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 Can. Vet. J. 37, 364-366.
61. Huong, L.T.T., Ljungstram B.L., UgglA A., Bjirkman, C. 1998. prevalence of antibodies to Neospora caninum and Toxoplasma gondii in cattle and water buffaloes in southern Vietnam. Vet. Parasitol. 75, 53-57.
62. Howe ,D K., et al., 1997. Development of molecular genetic for Neospora caninum a complementary system to Toxoplasma gondi. Methods: A conparation to mathods in enzymology 1, 123-133.
63. Jardine, J.E., Wolls, B.H., 1995. Bovine neosporosis in Zimbabwe. Vet. Rec. 137-223.
64. Jensen, L. Jensen T.K. Lind, P. Henriksen, S.A. Uggia, A., Bilic-Hansen, V. 1998. Experimental porcine neosporosis. Acta Pathol. Microbiol. Inmunol. Seand 106, 475-482.

65. Lally, N.C., Lenkins, M.C., Dubey, J.P. 1996b, Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an ELISA for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 3, 275-279.
66. Louie K. Syerlow KW, Barr, B.c. Anderson, M.L. Conrad P.A. Cloning and characterization of two recombinant neospora protein fragments and their use in sero diagnosis of bovine neosporosis *clinic diagn lab immunol.* 1997; 4; 692-937.
67. Long, M.T., Baszler, T.V., Fetal in balb/c mice infected with neospora caninum, J.P., *Parasitol* 1996, 86: 608-11.
68. Liddell, S. Jenkins M.C. Dubey J.P. 1999. Vertical transmission of *Neospora caninum* in BALB/c mice determined by PCR detection *J. Parasitol.* In press.
69. Lindsay, D.S., Rippey, N.S., Powe, T.A. Sartin, E.A., Dubey J.P. Blagburn B.L. 1995b, Abortions total death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of neospora caninum *Am. J. Vet. Res.* 56, 1176-1180.
70. Lindsay, D.S., Butler, J.M. biagburn, B.L. 1997. Efficacy of decoquinatate against *Neospora caninum* tachzoites in ecil cultures. *Vet. Parasitol.* 68, 35-40.
71. Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Duncan, R.B., 1999. Confirmation that dogs are a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 83, 327-333.
72. Lindsay, D.S., Keliy E.J., McKown, R. Stein, F.J., Plozer, J. Herman, J. Blagburn B.L. Dubey J.P. 1996a. Prevalence of *Neosporoa caninum* and *Toxoplasma gondi* In coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum* *J. Parasitol.* 82, 657-659.
73. Lindsay, D.S. Steinherg, H. Dubielzing, R.R. Semrad, S.D., Konkle, D.M. Miller, P.E., Blagburn, B.L. 1996b. Central nervous system neosporosis in a foal. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8,507-5, 10.
74. Long. M.T. Baszler, T.V. Mathison B.A. 1998. Comparison of intracerebral parasite load, lesion development and systemic cytokines in mouse strains infect with *Neospora caninum*. 3 *Parasitol.* 84, 316-320.
75. Lindsay, D.s. and b.L. Blagburn, 1987. Development of isospora suis from pigs in primary porcine and bovine cell cultures *veterinary parasitology* 24-301-304.

76. Marks, J. Lunden, A. Harkins, D. Innes, E. 1998. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol.* 20, 1-7.
77. McAllister, M.M. Dubey J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M. 1998a. Dogs are definitive hosts of *neospora caninum* *Int. J. Parasitol.* 28, 1473-1478.
78. McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., Dogs are hosts of *neospora caninum* *int J. Parasitol* 1998, 28:1473-8.
79. McAllister, M.M. Jolley, W.R., 1997a. Separation and cryopreservation of *Neospora caninum* tissue cysts from murine brain. *J. Parasitol.* 83-319-320.
80. McAllister, M.M. McGuire A.M. Jolley, W.R., Lindsay, D.S., Treos A.J., Stoban R.H. 1996b, Experimental neosporosis in pregnant ewes and their off spring. *Vet. Parasitol.* 33, 647-655.
81. McGuire, A.M. McAllister M.MN. Jolley, W.R. Anderson-Sprecher, R.C., 1997b, A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cysts in mice. *J. Parasitol.* 83-647-651.
82. Marsh, A.E., Barr, B.C., Packham, A.E., Conrad, P.A. Description of a new *neospora* species. *J., Parasitol* 1998, 84:983-91.
83. Magnino, S., Vigo, P.G., Fabbri, M., Colombo, M., Band, C., 1999, Isolation of fetuses a bovine *neospora* from a newborn calf in Italy *Vet. Rec.* 144, 4
84. Otter, A. 1997. *neospora* and bovine abortion *Vet. Rec.* 140-239.
85. Otter, A. Jeffrey M. Scholes, S.f. Helmick b. Wilesmith J.W., Trees, A.J., 1997. comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis *Vet. Rec.* 141-487-489.
86. Otter, A. Wilson, B.W. 1997. Bovine abortion outbreaks associated with *Neopora* and other infectious agents. *Vet. Rec.* 141, 659-660.
87. Packham, A.E., Syerlow, K.W. Conrad, P.A., Loomis, E.F., Rowe, J.D., Anderson, M.L., Marsh, A.E., Cray, C., Barr, B.C., 1998. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: Development, optimization and comparison to the indirect fluorescent antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 467-473.

88. Paré, J., Fecteau, G. Fortin, M., Marsolais, O., 1998. Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 1595-1598.
89. Paré, J., Thurmond M.C., Hietala, S.K. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhooood mortality *Can. J. Vet. Res* 60, 133-139.
90. Paré, J. Thurmond M.C. Hitala, S.K., 1997, *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83, 82-87.
91. Reichel, M.P. Drake, J.M. 1996. The diagnosis of neospora abortions in cattle. *New Zealand Vet. J.* 44, 151-154.
92. Sawada, M. Park, C.H., Kondo, H. Morita, T. Shimada, A. Yamane I., Umemura, T. 1998. Serological survey of antibody of neospora caninum in Japanese dogs, *J. Vet. Med. Sci.* 60, 853-854.
93. Sawada, M., Park, C.H., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T., Haritani, M., 1997. Pathological Finding of nude mice inoculated with bovine neospora *J. Vet. Med. Sci.* 59, 947-948.
94. Shares, G., Peters, M. Wurm, R. Barwald A. Conraths, F.J., 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques *Vet. Parasitol.* 80, 87-98.
95. Simpson, V.R., Monies, R.J., Riley, P. Cromey, D.S. 1997. Foxes and neosporosis *Vet. Roe.* 141-503.
96. Stenlund, S., Bjbrkman, C. Holmdabi, O.J.M., Kindahi, H., Uggia, A., 1997. Charecterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Pamitol. Res.* 83-214-219.
97. Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1996. Cuiling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 57, 1559-1562.
98. Sheffield, H.G. and M. Melton 1968. The fine structure and reproduction of *toxoplasma gondii* *journal of parasitology* 54: 209-2
99. Sheffield and F.A. Neva 1976. Development of Hammond hammondi in cell cultures. *Proceeding of the Helminthological society of Washington* 43: 217-225.

100. Speer, C.A., J.P. Dubey J.A. Blixt and B.L. Blagburn 1988. Development of *Hammondia heydorni* in cultured bovine and ovine cells. *Journal of protozoology* 35: 348-352.
101. Thurmond, M.C. Hictala S.K. blanchard, P.C. 1997, Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission *J. Vet. Diagn. Invest.* 9, 44-49.
102. Ugglå, A. Stenlund, S., Holmdahl O.J.M. Jakubek, E.B., Thebo, P. Kindahl, H. Bjorkman, C. 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves *Int. J. Parasitol.* 28, 1467-1472.
103. Waldner, C.L., Jansen, E.D., Ribbio, C.S., 1998 Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 685-690.
104. Woods, L.W., Anderson, M.L. Swin P.K. Syerlow K.W., 1994. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemianus columbianus*) *J. Vol. Diagn. Invest.* 6, 508-510.
105. Wouda, W., Brinkhof, J. Van Maanen, C. De Goe A.L.W., Moen A.R., 1998^a. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds; a comparative study of three enzyme linked immunosorbent assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 711-716
106. Wouda, W. Moen, A.r., Schukken, Y.H., 1998b, Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriolog.* 49, 1311-1316.
107. Wouda, W., Moen A.R., Visser, I.J.R., Van Knapen, F., 1997b, Bovine fetal neosporosis a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver, *J. Vol. Diagn. Invest.* 9, 180-185.
108. Yamane, I. Kokuho, t. Shimura, K., Eto, M. Shibahara. T. Haritani M. Ouchi, Y., Syerlow, K., Contad, P.A. 1997. In vitro isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan, *Res. Vet. Sci.* 63.

109. Yamane, I., Shibahara T. Kokuho T. Shimura T. Haritani M., Conrad, P.A. Park, C.H. Sawada M. Umemura, T. 1998. An improved isolation technique for bovine neospora species J. Vet. Diagn Invest. 10-364-368.