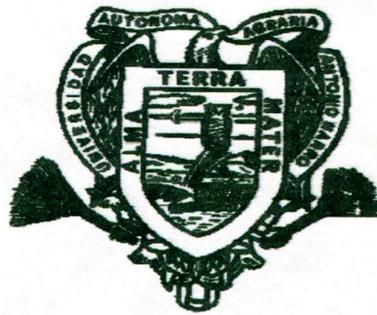


FECHA DE ADQUISICIÓN	
NUM. DE INVENTARIO	00269
PROCEDENCIA	
NUM. CALIFICACIÓN	
PRECIO	
DIST.	

	SF967
00269	.N46
	.S36 2006
	TESIS
	Ej.1

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

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS DE TAQUIZOITOS DE  
*NEOSPORA CANINUM* EN VACAS PREÑADAS INFECTADAS  
NATURALMENTE Y DE FETOS ABORTADOS.**

**POR**

**FLORENCIO ISRAEL SÁNCHEZ RODRÍGUEZ.**

**TÉSIS**

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

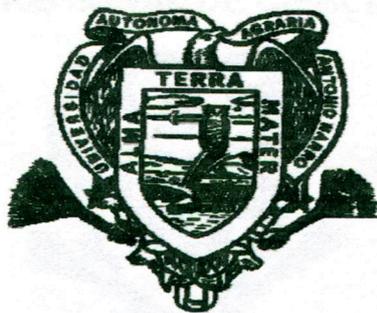
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TORREÓN, COAHUILA, MEX.**

**JUNIO DE 2006**

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

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS DE TAQUIZOITOS DE  
*NEOSPORA CANINUM* EN VACAS PREÑADAS INFECTADAS  
NATURALMENTE Y DE FETOS ABORTADOS.**

**POR**

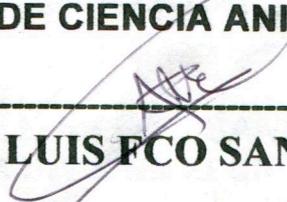
**FLORENCIO ISRAEL SÁNCHEZ RODRÍGUEZ.**

**APROBADO POR EL COMITÉ**

**PRESIDENTE DEL JURADO**

  
-----  
**MC. FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES**

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL  
DE CIENCIA ANIMAL**

  
-----  
**MC. JOSÉ LUIS PICO SANDOAL ELÍAS**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

**UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS DE TAQUIZOITOS DE  
*NEOSPORA CANINUM* EN VACAS PREÑADAS INFECTADAS  
NATURALMENTE Y DE FETOS ABORTADOS.**

**POR**

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

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**APROBADO POR**

  
\_\_\_\_\_  
**MC. FRANCISCO J. CARRILLO MORALES  
PRESIDENTE DEL JURADO**

  
\_\_\_\_\_  
**MC. JOSÉ LUIS FCO SANDOVAL ELÍAS  
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

  
Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal  
UAAAN - UN

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA**

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**

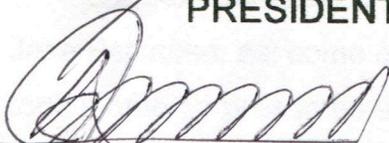
**TÉSIS**

**RECONOCIMIENTO DE ANTÍGENOS DE TAQUIZOITOS DE  
NEOSPORA CANINUM EN VACAS PREÑADAS INFECTADAS  
NATURALMENTE Y DE FETOS ABORTADOS.**



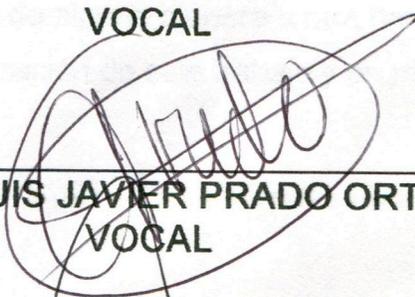
---

**MC. FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES  
PRESIDENTE**



---

**M.V.Z. JESÚS ALFONSO AMAYA GONZÁLEZ.  
VOCAL**



---

**M.V.Z. LUIS JAVIER PRADO ORTIZ  
VOCAL**



---

**M.C. SERGIO BARRAZA ARAIZA  
VOCAL SUPLENTE**

## AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por darme salud, fuerzas y así haber cumplido una meta tan importante en un momento de mi vida.

A mi "Alma Terra Mater", por haberme brindado la oportunidad de prepararme como profesional y permitir que se cumplieran todas mis metas en el periodo de mi carrera como estudiante.

De manera muy especial al **M.C. FRANCISCO J CARRILLO MORALES** por ser un amigo, ser el asesor principal en este trabajo y brindarme su apoyo y confianza.

A mi jurado de trabajo de tesis por participar en la revisión y estar presente en mi examen profesional.

A mis amigos Alfredo García, David Morales, Eliseo Valencia, Felipe Valencia, Luis Hernández, Israel Rodríguez, Bernardo, José Guadalupe, Miguel López, Saúl colín, Emilio Duarte, José Espinosa, así como a mis amigos y compañeros de trabajo por estar en todo momento presentes a ellos mil gracias.

A todas aquellas personas que de alguna manera u otra han participado desinteresadamente en la realización de este trabajo y en mi formación académica.

A los compañeros de grupo.

A mis colegas y amigos que brindaron su apoyo dentro y fuera de mi "Alma Terra Mater".

## DEDICATORIAS

A mi madre :

La **Sra. IRENE ALVARADO RODRIGUEZ** por brindarme todo su apoyo, dedicación, esfuerzo, y ternura durante esta etapa tan importante de mi vida.

A mi padre:

El **Sr. EDUARDO SANCHEZ CASTILLO** por brindarme su confianza, esfuerzo, cariño y hacer de mi un hombre responsable.

A mis hermanos:

**BLANCA SANCHEZ RODRIGUEZ Y EDUARDO SANCHEZ RODRIGUEZ**, por su apoyo que me brindaron en cada paso de mi vida a ellos mis más cordiales agradecimientos.

Gracias a ellos por estar conmigo siempre y darme la oportunidad de estudiar una carrera profesional, por ser mi inspiración de superación y ser una **FAMILIA EJEMPLAR**.

A toda mi familia, abuelitos, tíos y primos, por darme su apoyo y confianza, demostrándolo con palabras de aliento para seguir adelante en mi carrera profesional.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	I
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	4
CICLO BIOLÓGICO DE <i>Neospora caninum</i> .....	5
PREVALENCIA DE NEOSPOROSIS EN BOVINO.....	8
IMPACTO ECONÓMICO.....	10
PATOGENESIS.....	10
MORFOLOGÍA DE LOS TAQUIZOITOS.....	11
OBJETIVOS.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
TOMA DE MUESTRAS.....	14
TÉCNICA DE ELISA.....	15
SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> .....	17
ANÁLISIS DE DATOS.....	19
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	24
SUGERENCIAS.....	26
CONCLUSIONES.....	27
LITERATURA CITADA.....	28

## RESUMEN

Diferentes Aspectos de reconocimiento de antígenos de taquizoitos de *Neospora caninum* en novillos, vacas y fetos abortados infectados por *Neospora*, fueron estudiados.

El modelo de reconocimiento de antígenos y la relación entre los títulos de ELISA (DO) Densidad óptica y el No. De antígenos de *Neospora* detectados fueron evaluados además, los antígenos de los taquizoitos envueltos en el desarrollo de la respuesta inmune humoral desarrollada contra la infección en vacas normales y las vacas abortadas fueron también caracterizadas en la 1ra y 2do tercio de gestación.

La comparación del reconocimiento de antígenos de taquizoitos fue obtenida de fluidos torácicos y abdominales de fetos abortados y de sueros de vacas infectadas con *Neospora* que tuvieron aborto.

La cinética de reconocimiento de antígenos de *Neospora* fue estudiada en vaquillas infectadas y de fetos de vacas abortadas y no abortadas y durante la preñez basada en la frecuencia e intensidad de reconocimiento de 4 antígenos inmunodominantes- IDAS- 17- 18-35-37 y 60-62. Kda, se pudieron observar.

La correlación encontrada entre los resultados del análisis del Western Blot. Y los títulos de ELISA, fue la misma en las vaquillas, vacas y los fetos abortados.

Se hace mención especial el rol importante del IDA. Antígeno-17-18 Kda, que podría jugar un rol importante en el diagnóstico serológico de infecciones por *Neospora* en ganado ya que fue intensamente detectado en el 100% de los animales analizados.

El reconocimiento y comparación de los antígenos fue llevado a cabo de sueros de vacas abortadas de *Neospora*.

La infección de *N. caninum* en fetos abortados fue confirmada por la detección y características de las lesiones compatibles en cerebro por histopatología, y por la presencia de los títulos iguales o mas altos a los rangos de densidad óptica, (D.O). mayor a 0.50. en las pruebas de ELISA. Con títulos iguales o superiores a los controles positivos y negativos del kit de diagnóstico, siguiendo los pasos y especificaciones del fabricante IDEXX.

En las vacas abortadas la infección fue confirmada por la detección de anticuerpos específicos en el suero en títulos iguales o superiores de densidad óptica (D.O). a 0.50, en ELISA.

Como controles se usaron fluidos y sueros de 10 fetos abortados debido a otras causas de Neosporosis y el suero de 10 vacas negativas a infecciones de Neospora y sin ninguna historia de fallas reproductivas en los últimos 3 años.

Las muestras de los sueros fueron (tomadas) colectadas mensualmente desde 3 meses antes de la inseminación hasta 3 meses después del parto.

Las muestras controles fueron usadas de 10 vacas serológicamente negativas y de ganado con historia sin ninguna falla de problemas reproductivas en los últimos 3 año.

## INTRODUCCIÓN

La Neosporosis es una enfermedad parasitaria producida por *Neospora caninum* un protozooario perteneciente al Phylum apicomplexa, similar a *Toxoplasma gondii* pero diferente a éste ultraestructural y antigénicamente, causando desórdenes neuromusculares, parálisis severa y muerte en perros y abortos y morbilidad neonatal en ganado bovino lechero y de 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 y Lindsay., 1996).

Debido a la alta prevalencia en ganado bovino, *N.caninum* ha surgido como una enfermedad seria causando abortos en bovinos y otros animales, y problemas neurológicos en perros en los últimos 10 años. 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 y Lindsay.,1996). La neosporosis ha emergido como una enfermedad de impacto económico, 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. Infecciones a *Neospora caninum* son consideradas como una causa significativa de aborto y daños en la producción lechera y de carne alrededor del mundo y otros animales domésticos en muchos países. (Dubey et al., 1999).

## ANTECEDENTES

La Neosporosis no es una nueva enfermedad. estudios retrospectivo hechos. muestran que una severa enfermedad debido a *N. caninum* fue encontrada en un grupo de perros en los Estados unidos de Norteamérica en 1957, pero fue mal diagnosticada y confundida con *Toxoplasma gondii*. (Dubey et al., 1990).

*Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* son estructural, genética y antigenicamente muy relacionados (McAllister et al.1996;Lindsay et al.1998). En estudios realizados determinan que se requiere tomar una serie de precauciones al hacer generalizaciones basadas sobre la biología de *T. gondii* y relacionarlas con *N.caninum*, porque ambos parásitos inducen biológicamente distintas enfermedades; por ejemplo: *T. gondii* no causa una enfermedad clínica en ganado y la repetición congénita por toxoplasmosis en animales y otros roedores es rara. También se puede observar el estudio realizado por (Dubey et al., 1998), que nos ilustra las diferencias del control inmunológico de *N.caninum* comparado con *T. gondii*

En Estados Unidos en 1988, *Neospora caninum* fue aislado de una camada de cachorros con problemas de desórdenes neurológicos y parálisis, por (Dubey et al.1988.) 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 1992) 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) en ejidos fijados en formalina y tratadas con peroxidasa, y llegaron a la conclusión que ambos parásitos eran *Neospora caninum*.

## CICLO BIOLÓGICO DE *Neospora caninum*

La biología natural del parásito fue confirmada por (McAllister *et al.*, 1988 y Lindsay *et al.*, 1999) cuando los occistos fueron encontrados en las heces de los perros que se pudieron observar, confirmandose más tarde que estos últimos actúan como huésped definitivo. (Lindsay, D. S., J. P. Dubey, *et al.* 1999).

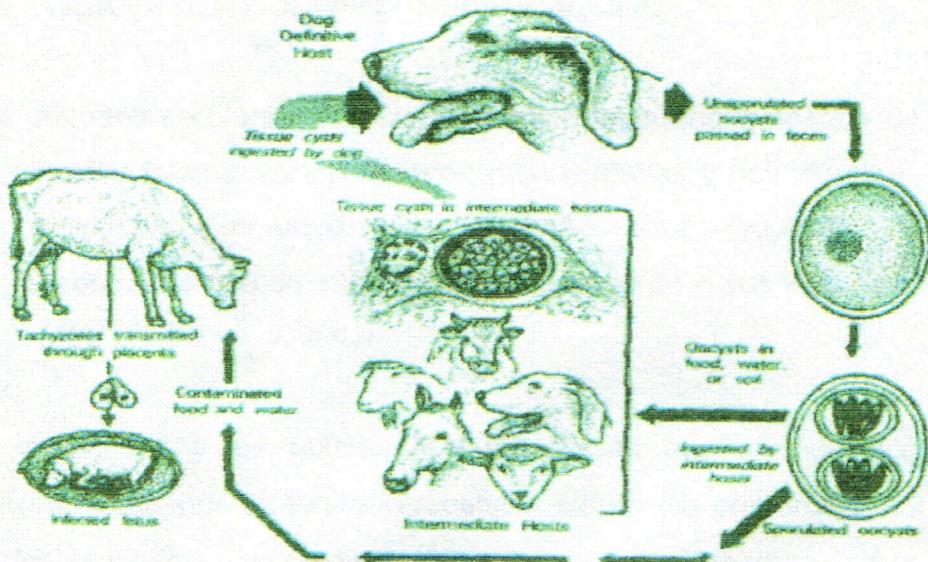


Fig. 1. Life cycle of *Neospora caninum*.

En el perro los signos clínicos de *N. caninum* pueden ser variados, y van desde paresia, parálisis ascendente rígida con hiperextensión de miembros anteriores, Ataxia, gliosis, retinitis, temblores musculares, fatiga, congestión pulmonar y dermatitis nodular con atrofia muscular (Dubey y Lindsay., 1996).

El valor económico de la neosporosis ha sido determinado en estudios realizados, determinando las pérdidas económicas de la reducción en la producción lechera y la de fetos abortados y otros aspectos. (Thurmond, M.C; Hietala, S.K., 1997).

En bovinos diferentes métodos serológicos han sido desarrollados para detectar anticuerpos específicos (Atkinson et.al. 2000; Bjorkaman et.al. 1999).

La neosporosis bovina ha sido diagnosticada en ganado adulto y en los fetos utilizando métodos directos para la detección del protozooario y sus quistes con técnicas histopatológicas, coproparasitología, inmunohistoquímicas y moleculares por la técnica de PCR, e indirectas como las técnicas de IFAT, DAT, Western blot, El inmunoblot a sido usado como ayuda de otras pruebas serologicas que se han utilizado como herramienta de rutina en muestreo de sueros de ganado. (Atkinson et.al., 2000), así como varios métodos de ELISA. (Wouda et.al., 1997., Jenkins et.al., 2002).

Los métodos serológicos utilizados para el inmunodiagnóstico de la neosporosis en sueros y fluidos fetales, con anticuerpo monoclonales y poli clónales además de los utilizados con antígenos inmunodominantes (IDAS) de los taquizoitos de *N.caninum*, han sido discutidos en diferencia de interpretación de acuerdo a sus valores obtenidos o valor de corte (cut-off ). (Jenkins et.al. 2002)

Los taquizoitos y los quistes son las etapas que se han encontrado en los hospederos intermediarios en forma intracelular, siendo los primeros  $6 \times 2 \mu\text{m}$  los quistes son redondos y ovals, de aproximadamente  $107 \mu\text{m}$ , encontrándose en el sistema nervioso central, incluyendo la retina, los taquizoitos han sido valorados por servir como fuente antigénica en los métodos de diagnóstico de la neosporosis. (Dubey et al 1988, Dubey y Lindsay 1999).

*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., 1996). Anticuerpos de *N.caninum* fueron encontrados en sueros de búfalos, coyotes, zorro rojo, y camellos, rinocerontes expuestos en forma natural, sugiriendo que estos huéspedes podrían ser huéspedes intermediarios de *Neospora caninum* (Lindsay et al., 1996, Buxton et al., 1997, Dubey et al., 1998, Hilali et al., Huong et al., 1998).

El cultivo in vitro ha facilitado el desarrollo de herramientas de diagnóstico para la detección de infecciones por *Neospora* y especialmente para discriminar neosporosis de otras enfermedades fuertemente relacionadas como toxoplasmosis y Sarcocystosis.

Las proteínas de superficie de todo parásito intracelular obligatorio son consideradas a jugar un rol crítico en la infección, estas proteínas podrían colectivamente ser un número de funciones importantes porque estas representan la interacción inicial con la célula huésped (*Naguleswaran, A. et al., 2001. Hemphill, A. 1996*).

En los taquizoitos de *N. caninum* aproximadamente 6 moléculas de superficie han sido identificadas y solo dos proteínas la NCSR52 y NCSA61 fueron clonadas recientemente estas proteínas están funcionalmente envueltas en la adhesión y en el proceso de invasión, sin embargo el bajo peso molecular de las proteínas de los taquizoitos cerca de 30 Kda pueden estimular in vitro la proliferación de CD4+ células T de becerros infectados experimentalmente con *N.caninum*, sugiriéndose el uso potencial de estas proteínas en estudios para producción de vacunas contra la neosporosis. (*Hemphill, A., B. Gottstein, y H. Kaufmann. 1996*).

En ganado infectado naturalmente, proteínas con pesos moleculares (MW), de sus siglas en inglés, de 25,65 y 116 kda han sido reportadas para reconocer sueros de vacas abortadas confirmadas con *Neospora* y de fetos abortados (*Baszler et al., 1999*). y el reconocimiento de tres o cuatro antígenos inmunodominantes de taquizoitos (IDAs), de sus siglas en inglés. (17.29/30, 37 y 46 kda) por sueros de vacas infectadas naturalmente ha sido consideradas para confirmación de infección. (*Schares et al., 1998.. Bjorkman y Hemphill, 19998. howe et al., 1998. Schares, et al., 1999*).

Sin embargo un Modelo común de reconocimiento de antígenos en las principales poblaciones de ganado a riesgo (fetos, vaquillas y vacas) todavía no ha sido bien establecido, Además la asociación entre ganado infectado y las fluctuaciones de anticuerpos durante la preñez y antígenos de *Neospora* envueltos no están claramente bien establecidos.

## PREVALENCIA DE NEOSPOROSIS EN BOVINO.

*Neospora caninum* afecta tanto al ganado lechero (Dubey y Lindsay 1996) como al ganado de carne (Hoar et al., 1996; Waldner et al., 1998). Y es considerada la mayor causa de abortos en ganado lechero en los Estados Unidos (Anderson, et al., 1995).

En los primeros reportes de (Barr, et al., 1994). en California del 8 al 19% de todos los fetos y bovinos enviados al laboratorio fueron diagnosticados por esta infección según la región geográfica y el 2.5 % de los abortos eran atribuibles a neosporosis (Anderson, et al., 1991-1995).

Una serie de reportes de seroprevalencia en varios países se encuentran reportados como los realizados por:

<b>Autor</b>	<b>País</b>	<b>Año</b>
Garcia, Vazquez, Z. et al.,	México	2002
Gennari, S. et al.,	Brasil	2002
Baszler, T.V et al.,	USA	2003
Campero. et al.,	Argentina	1998
Magnino	Italia	1998
Fondevila	España	1998

En estudios similares de prevalencia de Anticuerpos en Australia, Uruguay, Islandia, Falkland, Italia, Japón, Kenya, Tanzania, Suecia, Inglaterra, Bélgica, Nueva Zelanda, Dinamarca, fueron entre un rango de 0% a 22% por ( IFAT ) con títulos de 1:50. (Trees et al., 1993, Bjorkman et al., 1994, Cringoli et al., 1996 ; Rasmussen y Jensen., 1996; Barber et al., 1997 ; Sawada et al., 1998 ).

Un estudio de prevalencia de infección subclínica de neosporosis en una población de perros urbanos en Inglaterra fue realizado, obteniéndose 27 de 167 perros positivos (16.6%) a Anticuerpos de *Neospora caninum*. (Trees et al., 1993), y en U.S.A 22% fueron positivos de 229 perros y zorros grises examinados (Lindsay et al., 2001).

Con técnicas de IFAT con una dilución de sueros a 1:50 la seroprevalencia fueron 9% de 45 perros en Australia; 20% de 414 perros en Uruguay, Sudamérica; 0.2% de 500 perros de Falkland, Island y 0 de 140 perros de Kenya (Barber et al., 1997).

Con técnicas de (IFAT) Pruebas de anticuerpos fluorescentes fueron reportados anticuerpos anti-Neospora por (Barber et al., 1997); en 11% de 300 perros de Bélgica el 22% de 200 perros de Nueva Zelanda (Raichel et al., 1998, y Cringgoli et al; 1996; y el 29 % de 194 perros en Italia

Una inusual presentación de neosporosis clínica es la dermatitis, que es reportada en perros adultos. (Dubey et al., 1998, 1995).

La observación en estos casos es un severo parasitismo con un buen número de taquizoitos presente en varios músculos y otros órganos.

**Table 1. Estudios seleccionados de diagnostico de N. caninum asociados con abortos en ganado.**

Pais	No.de fetos examinados	Porcentaie infectado	Referencia
Argentina	240	12.1	Moore et al. (2002)
Australia	729	21.0	Boulton et al. (1995)
Brasil	46	39.1	Corbellini et al. (2002)
Alemania	135	12.6	Sondgen et al. (2001)
Mexico	211	77	Morales et al. (2001)
Suiza	242	21.0	Sager et al. (2001)
Holanda	2,053	17	Wouda et al. (1997)
USA	266	42.5	Anderson et al. (1995)

(Dubey, J.P., 2003.)

## IMPACTO ECONÓMICO.

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 y Hiatal 1996, 1997*), no hay datos confiables de las pérdidas económicas debido a la neosporosis en la industria del ganado en varias partes del mundo, solo un dato confiable en California, en donde el 20 al 43% de todos los abortos en bovinos son debidos a *neospora* son reportados por (*Anderson et al., 1991, 1995*); así como el 15 a 20% en Holanda son debido a *Neospora* reporta (*Dubey et al., 1996*).

Las pérdidas económicas estimadas en California relacionadas con *Neospora* son aproximadamente cantidad aproximada de 35 millones de dólares por año, de acuerdo (*Pare J. Thurmond et al., -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*).

## PATOGENESIS.

La neosporosis en el ganado se asocia con parálisis neonatal encéfalomiелitis abortivo entre el tercero y noveno meses de gestación, ocurre con mayor frecuencia entre los meses quinto y sexto. (*Dubey J.P. 1999*); no se encuentran lesiones macroscópicas características en fetos, placenta ni en neonatos y generalmente no existe retención placentaria, en becerro de 5 días de nacido, mostró incapacidad para ponerse de pie, a la necropsia presentaba despigmentación bilateral especialmente de la sustancia gris del cerebro (*Anderson et al 1991*).

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. *Neospora caninum* es un patógeno intracelular, puede matar rápidamente las células del huésped como consecuencia de multiplicación activa de taquizoitos produciendo necrosis, inflamación no supurativa y granulomas en los tejidos afectados.

Los signos clínicos solo han sido reportados en forma individual en becerros jóvenes de 2 meses de edad, el aborto es el único signo observado en vacas adultas, también se ha observado vacas de diferentes edades que con abortos que van desde el tercer mes de gestación hasta el término de ésta. Siendo los abortos más frecuentes los que ocurren entre el quinto y sexto mes de gestación, los fetos pueden morir en el útero, reabsorbido, momificado, autolizados, o nacen enfermos o nacen clínicamente normales pero infectados crónicamente con *N.caninum*, (*Dubey, 1998*).

Los becerros infectados con *N.caninum* pueden nacer bajos de peso y con signos neurológicos con los miembros anteriores flexionados o hiperextendidos revelando al examen neurológico, una severa ataxia, pérdida de reflejos, baja percepción, exoftalmia y se ha observado una apariencia asimétrica de los ojos. (*Anderson et al., 1991*).

## MORFOLOGÍA DE LOS TAQUIZOITOS

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 zoosporos por endodiogenia. (*Bjerkas et al., 1989. Speer, C. A. y J. P. Dubey 1989*).

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 subsiguiente reacción inflamatoria por parte del huésped. El tiempo que permanecen los quistes en el SNC aún no se conoce. (*Dubey J.P. Lindsay. D.S., 1996*).

## OBJETIVOS

Antígenos de *Neospora caninum* reconocidos en el suero de ganado infectado naturalmente, fueron investigados con el propósito de:

**Confirmar** si estos mismos antígenos (IDAs), se encuentran en los fluidos y tejidos de los fetos abortados en el patrón de reacción de reconocimiento al análisis del Western blot

**Comparar** el modelo de reconocimiento de antígenos de taquizoitos de *Neospora* por vaquillas, vacas y fetos abortados.

**Investigar** la relación entre los títulos de ELISA y el reconocimiento de antígenos de *Neospora*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar un perfil y establecer un modelo de reconocimiento de antígenos inmunodominantes de taquizoitos de *Neospora caninum* en poblaciones de ganado a riesgo, feto, vaquilla y vacas, de la Comarca lagunera, se llevó a cabo la siguiente investigación.

### **Muestreo de fetos abortados y no abortados y recolecta de sueros de vacas**

El muestreo para la obtención de fetos abortados y suero de vacas se realizó en establos de la comarca lagunera, localizada en la parte sur del desierto de Chihuahua y de una zona árida con afluencia de dos corrientes mínimas por los ríos Nazas y Aguanaval, con precipitaciones pluviales de alrededor de 200mm anuales, concentrada en 30 días de los meses de junio a octubre, con seis a siete meses de sequía definida con precipitaciones pluviales menores a 7 mm al mes.

## UBICACIÓN

El presente trabajo se realizó en municipios de la Comarca Lagunera de Coahuila: San Pedro, Francisco. I. Madero, Viesca, Matamoros y Torreón.

La Región Lagunera esta considerada como una zona agropecuaria e industrial formada por las porciones suroeste del Estado de Coahuila y noroeste de Durango, cuya extensión es de 31,523.3 Km<sup>2</sup>, comprendiendo en el estado de Coahuila cinco municipios: San Pedro, Torreón Francisco. I. madero, Matamoros y Viesca y en el estado de Durango Gómez Palacio, Lerdo, Mapimí, Tlahualilo de Zaragoza, y añade el municipio de Nazas. Además señala que los municipios mas grandes son los de San Pedro con 9942.4 km<sup>2</sup>, Mapimí con 71.26.7 Km<sup>2</sup> y Francisco I Madero con 4933.9 Km<sup>2</sup> constituyendo un 69.8% del total de la Comarca Lagunera. Si embragó según (SARH, 1985) considera en la Región Lagunera. Quince municipios los que agrupa el Distrito de riego No. 17., General Simón Bolívar, Gómez Palacio, Lerdo, Mapimí, Nazas, Rodeo, San Juan de Guadalupe , San Luis del Cordero, San Pedro el Gallo, y Tlahualilo de Zaragoza en el Estado de Durango y en Coahuila, Fco. I. Madero, Matamoros, San Pedro Torreón y Viesca. (Cuadro (1)).

**CUADRO 1. Ubicación geográfica de los municipios de la Región Laguna (SARH, 1985).**

MUNICIPIOS	LONGITUD		LATITUD	
Fco. I. Madero	102°56'	103°44'	25°45'	26°56'
Matamoros	102°59'	103°25'	25°45'	25°47'
San Pedro de las Colonias	102°00'	103°34'	25°38'	26°56'
Torreón	102°53'	103°34'	24°48'	25°41'
Viesca	102°35'	103°19'	24°42'	25°38'
General Simón Bolívar	103°13'27"		24°41'19"	
Gómez Palacio	103°29'00"		25°32'00"	
Lerdo	103°31'19"		25°32'46"	
Mapimí	104°29'14"		26°14'06"	
Nazas	104°06'39"		25°13'34"	
Rodeo	104°33'29"		25°10'50"	
San Juan de Guadalupe	102°46'41"		24°37'50"	
San Luis del Cordero	104°16'37"		25°25'06"	
San Pedro del Gallo	104°17'33"		25°33'51"	
Tlahualilo	103°26'26"		26°06'42"	

**La Comarca Lagunera se encuentra dentro de una Región Hidrológica identificada con el número RH-36 (Figura 1.)**



## **TOMA DE MUESTRAS**

Para la realización del estudio se tomaron siguientes muestras de:

- 20 fluidos cerebroespinal, torácicos y abdominales de fetos abortados.
- 10 sueros de vacas abortadas con serología positiva a *Neospora*, que fueron confirmadas por la presencia de anticuerpos específicos de *Neospora* en los sueros por la técnica de ELISA, de acuerdo a la utilizada por el Laboratorio IDEXX.

Las infecciones de los fetos de bovinos abortados fueron pre examinadas por técnicas inmunohistoquímicas técnica según (Dubey, J.P. et al., 1997. y Lindsay, D:S. y Dubey, J.P. 1989); la detección de características o lesiones compatibles en cerebro y otros órganos a *Neospora* fue por histopatología, técnica según, (Wouda, 1997 Lindsay, D:S. y Dubey, J.P. 1997).

Un grupo de 10 sueros y de fluidos de fetos abortados debido a otras causas de neosporosis, sirvieron como controles.

10 sueros de vacas positivas a infecciones por *Neospora* y con historial de fallas reproductivas en los últimos tres años fueron usados como grupo control positivo.ñ

Como control Negativo se utilizaron 10 sueros negativos a *Neospora* de vaca que no hayan tenido fallas reproductivas ni antecedentes de abortos en los últimos 3 años.

En todos los casos después de la recuperación de los sueros y los fluidos fetales fueron previamente analizados para la detección de anticuerpos específicos de *Neospora* por técnicas de ELISA y Western Blot. Pasando a ser almacenados a crió preservación en alícuotas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso correspondiente siguiendo los procedimientos, según (Bjerkas y Dubey., 1994).

Se obtuvieron los datos directamente de la base de datos computarizada de los establos para registrar el comportamiento reproductivo de las vacas.

20 fluidos cerebroespinal y otros órganos de fetos abortados	10 sueros de vacas	10 sueros de vaquillas	10 sueros control de otras enfermedades
10 sueros controles (+) positivos	10 sueros controles (-) negativos	Determinación de antígenos en base a su peso molecular 20 vaquillas 20 vacas No abortadas	Determinación de antígenos en base a su peso molecular 20 vacas abortadas 20 vaquillas

## TÉCNICA DE ELISA

El procedimiento básico para la demostración de anticuerpos IgG fúe usando en el kit inmunológico del laboratorio IDEXX.

Fúe evaluado siguiendo un método de análisis de regresión.

Y de acuerdo al protocolo del Kit comercial de anticuerpos anti-*Nospora*, finalmente se determinaron los valores predictivos.

## PROCEDIMIENTO

El ensayo inmunoenzimático fue usado para detectar anticuerpos contra *Neospora caninum* siguiendo los pasos que especifica el fabricante IDEXX.

Las micro placas fueron sensibilizadas con el antígeno inactivado de *Neospora caninum*.

Las muestras de suero fueron muestreadas por duplicación en una dilución final de 1:10 e incubadas a 90 minutos y a una temperatura ambiental del laboratorio después de la incubación, las placas fueron lavadas tres veces con tween.

Los pozos de las placas fueron sensibilizadas con 200 ml. de conjugado anti-ruminal IgG diluido de 1:200 en la dilución del kit. e incubada a una temperatura de laboratorio por 90 minutos finalmente después del lavado de placas, la reacción fue revelada con la adición de 200ml con la solución del cromógeno.

La densidad óptica fue leída 10 minutos después de la adición del cromógeno usando un espectrofotómetro a 405 MN manómetros los duplicados de las diluciones ópticas fueron promediados y la densidad óptica del control positivo y las muestras fueron corregidas en la substracción de la densidad óptica del control negativo.

Los resultados fueron expresados en porcentajes usados por la siguiente formula:

DO de muestras -----DO control negativo

Por 100%

DO control positivo----DO control negativo.

Basado en los resultados obtenidos los sueros fueron considerados negativos con valores menores al 40% y 50% y positivos mayor del 50% de acuerdo a los valores positivos por el fabricante.

## Valores predictivos:

La sensibilidad y la especificidad son dados por el fabricante y que son considerados valores de 97.5 y 95.1%.

La técnica de electrofóresis de geles de poliacrilamida fue la misma realizada (Laemmli., 1970); en 12.5%.

## SDS\_PGE y Western Blot

### Cultivo de taquizoitos de *Neospora caninum* y preparación de antígeno

El aislado de la cepa NC-1 fue donado por el DR J. P. Dubey y fue mantenido in Vitro por continuos pasajes en cultivo de células Vero. El cultivo infectado fue mantenido por minummun essential médium (MEM) suplementado con L-Glutamina, Penicilina, estreptomocina y 2% de suero de caballo de acuerdo al método utilizado (Lindsay y Dubey, 1989).

Los taquizoitos fueron purificados por filtración utilizando filtros de 5  $\mu$ m.

El purificado el *N.Caninum* se lavo en (PBS) frío estéril con un pH (7.2). Y centrifugado a 600 X g por 10 minutos.

Se realizo la resuspensión de taquizoitos en PBS a su concentración final de aprox. .107 taquizoitos por ml. y se guardaron hasta su uso.

Para obtención de las proteínas solubles de *N.Caninum* el contenido de taquizoitos fue almacenado en viales a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para la purificación fue concentrada a ( $2 \times 10^9$ ) y se resuspendido en 1 ml. de 10mM-tris-HCL, conteniendo 2 mM de fenilmetilsulfonil fluor, y con tratamiento de ultrasonido en baño de hielo y centrifugado a 10,000 x g por 2 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . La determinación de la proteína fue utilizando el micro Bca.Prot.Assay.Method (Smith et al., 1985). Las proteínas purificadas fueron alicuoteadas y crío conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$

Las proteínas de *N. caninum* (2 mg/ml) fueron en igual volumen a la muestra en un buffer de 4%, (v/v) B-mercapto etanol y 2% (w/v) de SDS poniéndose a hervir por 5 minutos. Después de la realización de las muestras se determinaron los valores predictivos.

Proteínas Standard de bajo peso molecular (MW) fueron sometidas a comparación con las bandas de los diferentes antígenos reconocidos.

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa para la técnica de Western blot.

Se realizaron lavados en un Buffer Tris Fosfato al 0.05% tween-20 (TBS-T).

Se encubaron toda la noche con solución de bloqueo con (TBS-T) con 3% (W/V) de seroalbúmina bovina.

Se realizó un segundo lavado con TBS-T.

Incubación con sueros y fluidos fetales diluidos 1:100 y 1.50, respectivamente con solución de bloqueo por 1 horas a 37°C.

3 lavados con TBS-T por 10 minutos cada uno.

Las membranas de nitrocelulosas fueron expuestas a un anticuerpo monoclonal de ratón antibovino IgG1 e IgG2 (1:200).

Conjugado por peroxidasa y se incubo a 1 hora a 37°C.

Lavado con TBS-T.

Revelado de bandas con 4-cloro-1-naphthol-como substrato.

Como alternativa se puede indicar conjugado de conejo anti IgG bovino con peroxidasa para comparar los antígenos inmunoindependientes reconocidos.

(Dubey, j.p., 1999).

## ANÁLISIS DE DATOS:

Para las vacas abortadas y fetos abortados, las proteínas de taquizoitos de *Neospora* fueron clasificadas de acuerdo a los reconocimientos de frecuencia e intensidad en el análisis de Western Blot.

Para investigar las diferencias de intensidad 3 categorías fueron utilizadas: baja, media y alta, dándole un valor numérico a cada categoría (1, 2 y 3). No de IDAs. La frecuencia e intensidad de reconocimiento fue analizada en cada grupo.

La relación entre ELISA y el reconocimiento de antígenos de *Neospora* en el análisis de Western Blot fue estudiada en las vacas y fetos.

Los valores de intensidad y frecuencia por animal fueron evaluados por un análisis estadístico.

Los porcentajes de fetos y vacas y el reconocimiento de cada banda de proteínas fueron comparados aplicando un análisis de tabla de contingencia

U-Test fue empleado para checar la homogeneidad de los diferentes grupos

Los cálculos se hicieron usando el stat-view v.4.0

## RESULTADOS

El reconocimiento de antígenos inmunodominantes de taquizoitos de *Neospora caninum* en vacas y fetos abortados, fue estudiado y valorado

La frecuencia e intensidad de antígenos de taquizoitos de *Neospora caninum* en vacas y fetos abortados se puede apreciar en la tabla I.

El reconocimiento de los antígenos fue similar en vacas y fetos (*Fig. 1*), y no se encontraron diferencia significativa entre el número total de antígenos reconocidos por cada grupo  $V = 90.5$ ;  $P = 0.05 >$ . Cuando se utilizaron dos anticuerpos secundarios diferentes no hubo diferencia significativa pero se pudo apreciar a los antígenos menores o no inmunodominantes.

En la banda de los controles negativos de fluidos fetales y sueros de vacas usados no se observo nada de marcaje de antígenos de *Neospora*.

En ambos casos cuatro bandas comunes de antígenos inmunodominantes (IDAs) fueron seleccionadas tomadas en cuenta la frecuencia de aparición y la intensidad de reconocimiento, siendo estos los siguientes antígenos inmunodominantes (IDAs), 17-18, 34-35, 37 y 60-62 Kda, respectivamente.

Otro resultado o rango importante de ambos grupos fue el intenso reconocimiento de los Ag.(IDAs) . De 17 y 18 kda. por el 100% de los animales.

Ninguna diferencia significativa en el total del numero de IDAs detectado en ambos grupos fue encontrado.

Las proteínas de 17-18 kda. Junto con la de 34-35 kda. Y 37 kda. Fueron reconocidas por el 75% de los fetos abortados mientras que en el 94% de vacas abortadas siempre se detecto las bandas de proteínas de 17-18 y 60-62 kda en forma simultánea y el 76 % de las vacas abortadas reconocieron las bandas de las proteínas 17-18, 34-35 y 60-62 kda.

**Tabla 1**

frecuencia (%) e intensidad de reconocimiento de antígenos de taquizoitos de *Neospora* de Vacas y fetos abortados en la Comarca Lagunera.

MW(Kda)	IDAs (frecuencia (a) / intensidad (b))		(frecuencia) a de Antígenos Menores	
	Fetos	Vacas	Fetos	Vacas
77			9	11
67			18	11
60-62	20/+	15/++		
55-57			17	13
53			15	14
51 47			0	15
41			17	16
37	15/++	13/++	0	9
35-34	15/++	17/++		
30			0	21
28			20	18
24			0	21
17-18	100/+++	100/+++		

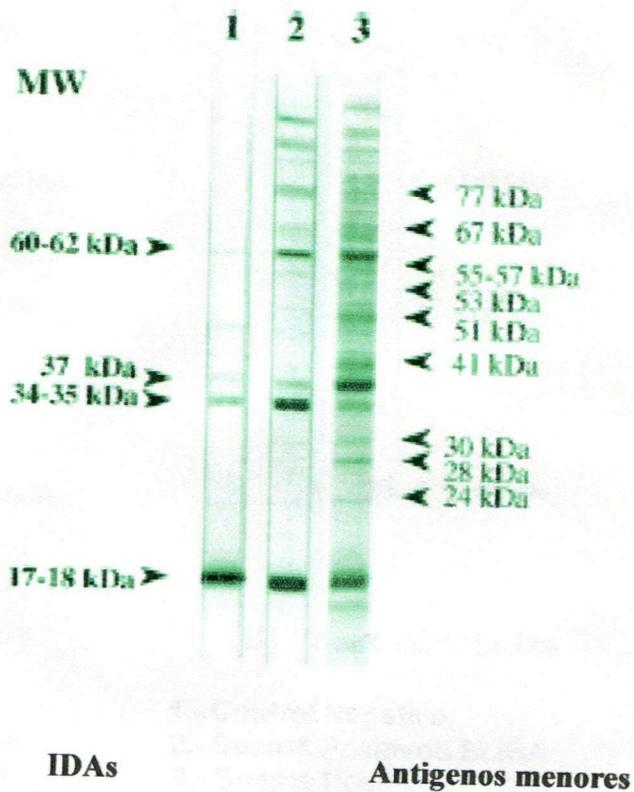
a).- frecuencia de reconocimiento es expresado en porcentajes de animales detectando los diferentes antígenos de *Neospora*

b.-La intensidad de reconocimiento es expresado por-- (1)+ baja intensidad de reconocimiento (2)++, media intensidad de reconocimiento (3) +++alta intensidad de reconocimiento.

MW peso molecular,

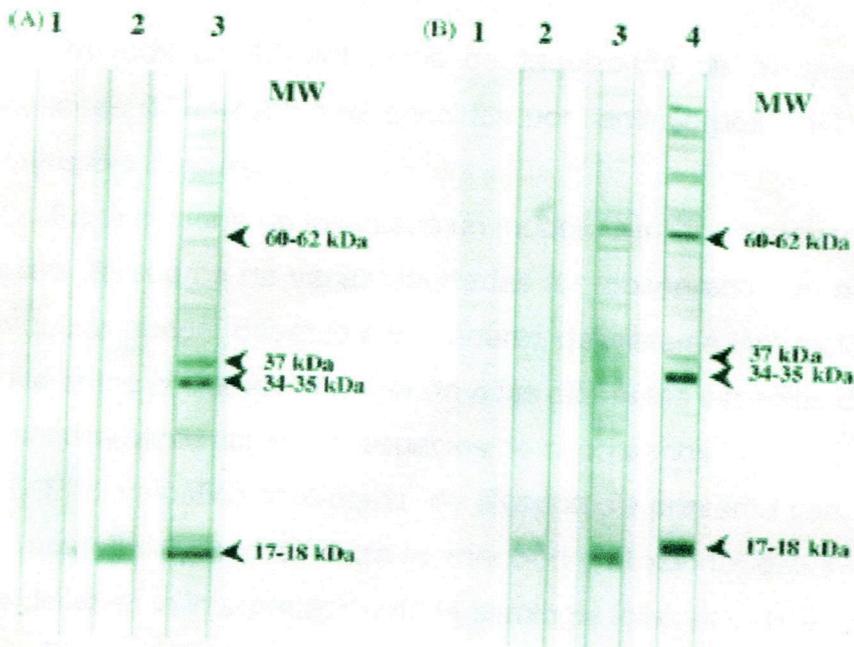
(IDAs), antígenos inmunodominantes.

**(Fig. 1) Reconocimiento de Antigenos inmunodominante (IDAs) de Taquizoitos de *Neospora caninum* en fetos y vacas Abortadas de la Comarca Lagunera**



- 1.- Fetos Abortados
- 2.- Vacas Abortadas
- 3.- Vacas Abortadas Infeccionadas Naturalmente  
(IDAs) Antigenos inmunodominates

(Fig. 2) Relación entre títulos de ELISA y Reconocimiento de Antígenos de Taquizoitos de *Neospora caninum*



(A) Fetos Abortados

(B) Vacas Abortadas

- 1.- Control Negativo
- 2.- Control positivo ELISA
- 3.- Sueros positivo ELISA

- 1.- Control Negativo.
- 2.- Sueros Positivos ELISA
- 3.- Sueros Positivos ELISA
- 4.- Sueros Positivos ELISA con Ac Policlonal Secundario.

## DISCUSIÓN

Un total de 12 antígenos de taquizoitos de *Neospora* en el rango de 14- 94 kilodaltones (Kd), fueron reconocidos por anticuerpos IgG de vacas y fetos abortados por *Neospora caninum*.

En la mayoría de los casos un modelo similar de reconocimiento de antígenos en la muestra de sueros de vacas abortadas fue observado con alta frecuencia e intensidad esto quizás pueda deberse a la madurez del sistema inmunológico y la exposición previa de diferentes antígenos incluyendo a las diferentes especies de protozoarios relacionados filogenéticamente como las especies de coccidarios.

El diagnóstico serológico de Neosporosis presenta varias limitaciones la edad fetal y el tiempo comprendido entre la infección y el aborto, estos factores son importantes a considerar en la interpretación de la serología fetal. (Wouda .w, y Dubey J.P. 1997)

Con menos diferencia se observa en el reconocimiento de antígenos menores entre las vacas y fluidos de los sueros esto podría atribuirse a la individualidad propia del huésped y a las variaciones del parásito. (Bjerkas et.al. 1994).

Una buena correlación entre los títulos de Elisa y el número de antígenos reconocidos por las vacas y fetos abortados fue encontrado en el presente trabajo mientras que de acuerdo a (Baszler et. al., 1996). el modelo de reconocimiento encontrado en el inmumoblot fue variable y no fue relacionado a los títulos de (D.O) densidad óptica en la prueba de Elisa.

Por otro lado los fetos abortados en el tercer tercio de gestación mostraron lecturas mas altas de densidad óptica y reconocieron a un mayor número de antígenos de *Neospora caninum* comparados con los fetos abortados en el segundo trimestre de gestación esto podría deberse al desarrollo del sistema inmune en el feto por no ser inmunocompetentes en esa edad.

Si los fetos pueden controlar la infección después del segundo mes de preñez, cuando el desarrollo del sistema inmune todavía no esta bien completo, una elevación de títulos de anticuerpos ocurre, por otra cuestión los primeros antígenos son los (IDAs) y cuando los títulos de anticuerpos comienzan a incrementarse estos (IDAs) son reconocidos junto con otros antígenos menores.

Se han obtenido resultados similares por (Cazabonne et.al., 1994). Cuando el primer IgG anticuerpo limito a los antígenos mayores y los anticuerpos que aparecen después revelaron otros antígenos menores a una intensidad mas débil.

Basados en la frecuencia e intensidad de reconocimiento, cuatro IDAs antígenos inmunodominantes 17-18, 34-35, 37 y 60-62 Kda. Proteínas de taquizoitos fueron identificadas por vacas y fetos abortados en el presente trabajo.

La identificación de cuatro IDAs de 17, 29-30 y 37 Kda. De suero de diferentes especies animales incluyendo ganado han sido previamente descritos por (Bjerkas, et.al.; 1994); y mas reciente otros grupos han considerado un grupo de antígenos de 16-17, 29-30, 37 y 46 Kda. (Schaes et.al., 1998; Atkinson et.al., 2000). IDAs de *Neospora caninum* para ganado sin embargo, Baszler, et.al., 1996 encontró solo antígenos de 25,65 y 116 Kda por todas las muestras de suero de vaca infectada por *Neospora*.

Nuestros resultados confirman la importancia de las proteínas 17,18 y 37 KDA como antígenos inmunodominantes importantes en el inmunodiagnóstico.

Sugerimos de acuerdo a nuestros resultados la relevancia de otros dos antígenos de *N.caninum* de 37-35 y 60-62 kda, como IDAs.

El antígeno de 17 kda. Aparece ser el IDA más importante por antígenos de vacas y fetos abortados por *Neospora*, que fue reconocido con una alta intensidad por todas las muestras positivas examinadas.

Por el contrario (Atkinson et.al., 2000), considero las proteínas de 29-30 y 37 kda. Como los antígenos mas comunes (Bjerkas, et.al., 1994); encontró sólo el antígeno a la proteína 17 solo con títulos de baja densidad óptica en ELISA y IFAT.

Estas diferencias de reconocimiento de antígenos observada por varios autores podría ser principalmente debidas a las diferentes condiciones del desarrollo del Inmunoblot y el origen de las muestras.

Una proteína con peso molecular (MW.), en el rango de 17-18 kda, también fue reportado por otros autores (Barta and Dubey.,1992. Bjerkas et.al., 1999. Bjorkman et.al. 1994; Schaes et.al., 1999; Atkinson et.al., 2000) y se considera pertenecer a un IDA de taquizoito de *Neospora*. (Bjerkas et.al., 1994; Bjorkman et.al., 1994).

Se describe también la existencia de un nuevo IDA de 60-62 Kda. estas bandas fueron significativamente menos reconocidas por las muestras de suero y fluidos fetales que las muestras de suero de ganado adulto.

## SUGERENCIAS

Se sugiere hacer una relación entre las fluctuaciones cuantitativas y cualitativas de anticuerpos a través de toda la preñez y los cambios en el reconocimiento de antígenos en un grupo de vacas abortadas y no abortadas infectadas por *Neospora*.

Así como el aumento en los títulos de densidad óptica relacionados al tiempo del aborto de acuerdo a (*Quintanilla- Gonzalo et.al., 2000*), en la que correlaciono el reconocimiento con alta intensidad de varios antígenos con bajo peso molecular ya que al contrario el patrón de reconocimiento de esta proteína permanece inalterado en vacas crónicamente infectadas que no abortaron así como detectar la fase responsable para la infección aguda y la fase responsable para la infección latente ya que los cambios en la intensidad de reconocimiento de esta proteína podrían relacionarse con una infección aguda o una reactivación de una infección crónica.

El antígeno de 17.8 kda. Ha sido sugerido como un posible blanco para el sistema inmune del huésped durante las infecciones crónicas y esta proteína podría ser un buen marcador de diagnóstico de una neosporosis crónica ó activa de los animales infectados.

## CONCLUSIONES

Un común modelo de reconocimiento de antígenos de taquizoitos de *Neospora caninum* fue establecido en dos poblaciones de bovinos infectados naturalmente con perspectivas del mejoramiento del serodiagnóstico. Cuando fue comparado el Western Blot con la técnica de ELISA, la intensidad y frecuencia de reconocimiento de antígenos dependió principalmente de los títulos de densidad óptica en ELISA. En relación a los antígenos involucrados en la fluctuación de anticuerpos en toda la preñez se sugiere analizar esta en estudios con vacas infectadas abortadas y vacas no abortadas debido a los resultados de la gran intensidad de reconocimiento de un antígeno de 17-18 Kda, por ganado abortado, se sugiere el valor del posible diagnóstico del antígeno 17-18-Kda y el nuevo descrito de 60-62 Kda, que se consideran junto con el antígeno de 34-35 Kda y el de 37kda como Antígenos inmunodominantes (IDAs) de taquizoitos de *Neospora*.

## LITERATURA CITADA

- Alvarez-Garcia, G., J. Pereira-Bueno, et al. (2002). "Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Vet Parasitol* 107(1-2): 15-27.
- 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
- Anderson, M.L., Palmer, C.W., Thurmond, M.C., 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.
- Atkinson, R., Harper, P.A.W., Reichel, M.P., Ellis, J.T., 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol. Today* 16, 110-114.
- Barber, J.S., van Ham, L., Polis, I., Trees, A.J., 1997. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. *J. Small Anim. Pract.* 38, 15-16.
- 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.
- Barta, J.R., Dubey, J.P., 1992. Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by Western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitol. Res.* 78, 689-694.
- Baszler, T.V., Knowles, D.R., Dubey, J.P., Gay, J.M., Mathison, B.A., McElwain, T.F., 1996. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition ELISA. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1423-1428.
- Baszler, T.V., Knowles, D.P., Dubey, J.P., Gay, J.M., Mathison, B.A., McElwain, T.F., 1996. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1423-1428.
- Bjerkás, 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, 214-221.
- Bjerkás, I., Mohn, S.F., Presthus, J., 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70, 271-274.
- Björkman, C., Holmdahi, O.J.M., Uggia, A., 1997. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet. Parasitol.* 68, 251-260.
- Björkman, C., Uggia, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 29, 1497-1507.
- Campero, C.M., Anderson, M.L., Conosciuto, O., Odriozola, H., Bretschneider, O., Poso, M.A., 1998. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet. Rec.* 143, 228-229.
- Cringoli, G., and Capuano, G., 1996. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dog sera. *Parassitologia* 38, 282.

- Dubey, J.P., Abbitt, B., Topper, M.J., Edwards, J.F., 1998. Hydrocephalus associated with *Neospora caninum*-infection in an aborted bovine foetus. *J. Comp. Pathol.* 118, 169-172.
- Dubey, J.P., Beattie, C.P., 1988. *Toxoplasmosis of animals and Man.* CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 1-220.
- 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.
- Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Adarns, D.S., McAlister, M.M., Anderson-Sprecher, R., Baszler, T.V., Kwok, O.C.H., Lally, N.C., Bjč Srkman, C., Uggia, A., 1997. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Parasitol.* 83, 1063-1069.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vel. Parasitol.* 67, 1-59.
- 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.
- Dubey, J.P., 2003 Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals *The Korean Journal of Parasitology* Vol. 41, No. 1. 1-16.
- Edelhofer, and F. J. Conraths. 2000. Use of purified tachyzoite surface antigen p38 in an ELISA to diagnose bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 30:1123-1130.
- Fondevila, D., Añor, S., Pumarola, M., Dubey, J.P., 1998. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. *Vet. Parasitol.* 77, 187-189.
- García, V, Z. et al., 2002. "Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico." *Vet Parasitol* 106(2): 115-20.
- Gennari SM, Yai LEO, D'Auria SNR, et al. (2002) Occurrence of *Neospora caninum* antibodies in sera from dogs of the city of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 106: 177-179.
- Hemphill, A. 1996. Subcellular localization and functional characterization of Nc-p43: a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Infect. Immun.* 64:4279-4287.
- Hemphill, A., B. Gottstein, and H. Kaufmann. 1996. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology* 112:183-197.
- Hilali, M., Romand, S., Thulliez, P., Kwok, O.C.H., Dubey, J.P., 1998. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in sera from camels from Egypt. *Vet. Parasitol.* 75, 269-271.
- Jenkins, M., T. Baszler, et al. (2002). "Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion." *Int J Parasitol* 32(5): 631-6.
- Lindsay, D. S., D. M. Ritter, et al. (2001). "Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*." *J Parasitol* 87(4): 909-11
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1989. In vitro development of *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) from dogs. *J. Parasitol.* 75, 163-165
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1981-1983.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Duncan, R.B., 1999. Confirmation that dogs are a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 82, 327-333.
- Magnino, S., Vigo, P.G., Bandi, C., Colombo, M., Giuli, L.D., Fabbi, M., Genchi, C., 1998. A proposito di neosporosi in Italia. *Summa* 15, 25-27.

- 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.
- Moore, D. P., C. M. Campero, et al. (2002). "Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina." *Vet Parasitol* 107(4): 303-16
- Naguleswaran, A. et al., 2001. *Infection and Immunity*, Vol. 69 No. 10 p. 6483-6494.
- Paré, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C., 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 352-359.
- Pereira Bueno J, Quintanilla-Gozaolo, Pérez Pérezv, Espi Felgueroso, Álvarez García G, 2002. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet parasitol* 111:2-3 143-52
- Quintanilla-Gozaolo, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L.M., 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int. J. Parasitol.* 30, 900-906.
- Rasmussen, K., Jensen, A.L., 1996. Some epidemiologic features of canine neosporosis in Denmark, *Vet. Parasitol.* 62, 345-349.
- Reichel, M.P., 1998. Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. *New Zealand Vet. J.* 46, 38.
- Sawada, M., Park, C.H., Kondo, H., Morita, T., Shimada, A., Yamane, I., Umemura, T., 1998. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *J. Vet. Med. Sel.* 60, 853-854.
- Schares, G., Dubremetz, J.F., Dubey, J.P., Bärwald, A., Loyens, A., Conraths, F.J., 1999. *Neospora caninum*: identification of 19-, 38-, and 40-kDa surface antigens and a 33-kDa dense granule antigen using monoclonal antibodies. *Exp. Parasitol.* 92, 109-119.
- Schares, G., M. Rauser, P. Sondgen, P. Rehberg, A. Barwald, J. P. Dubey, R.
- Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Bärwald, 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.
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K., 1997. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first lactation dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210, 672-674.
- Trees, A. J., F. Guy, et al. (1993). "Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England." *Vet Rec* 132(6): 125-6.
- Woods, L.W., Anderson, M.L., Swiñ, P.K., Syerlow, K.W., 1994. Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemianus columbianus*). *J. Vol. Diagn. Invest.* 6, 508-510.
- 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.