



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

**DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE
Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

RAÚL MIGUEL REYES SANDOVAL

TUTOR

DR. JUAN JOSÉ OJEDA CARRASCO

TUTORES ADJUNTOS

DR. ENRIQUE ESPINOSA AYALA

PhD. JESÚS ANTONIO ÁLVAREZ MARTÍNEZ

AMECAMECA, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2016

DEDICATORIA

A mi hija

Mall

Por ser el hermoso motor que mueve mi vida, por enseñarme que las cosas simples son tan valiosas y por alegrarme con tu pequeña sonrisa. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

A la Secretaría de Educación Pública (SEP) por el financiamiento del proyecto de investigación DSA/103.5/14/7529 “Mejoramiento de la productividad y competitividad ganadera a través del control de la neosporosis bovina”. Del cual deriva este trabajo.

Al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) del INIFAP por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo de laboratorio.

Al personal de la unidad de Babesia: Carmen Rojas, Patricia Vargas, Irene Castillo, José Juan Lira y Diego Polanco por el apoyo, tiempo y consejos, pero muy en particular por la paciencia.

Al Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo por las facilidades brindadas en la búsqueda de bibliografía.

Al Dr. Enrique Espinosa Ayala por la ayuda y asesoramiento.

Al Dr. Jesús Antonio Álvarez Martínez por la dirección del trabajo de investigación y de laboratorio, y el tiempo otorgado.

Al Dr. Juan José Ojeda Carrasco por el valor de aceptarme, por los consejos, el apoyo, el tiempo y la amistad. Gracias por creer en mí.

Al MVZ José Maya Netro por el paro.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
	2.1 Agente etiológico, Variabilidad genética y Virulencia.....	3
	2.2 Hospederos.....	4
	2.3 Ciclo de vida.....	5
	2.4 Transmisión.....	9
	2.5 Distribución de la enfermedad.....	10
	2.6 Signología.....	12
	2.7 Inmunidad.....	13
	2.8 Abortos endémicos, epidémicos y esporádicos.....	16
	2.9 Factores de riesgo, temporalidad y espacio.....	17
	2.10 Diagnóstico.....	19
	2.10.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	19
	2.10.2 Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	20
	2.10.3 Histopatología.....	20
	2.10.4 Inmunohistoquímica.....	20
	2.10.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
	2.10.6 Aislamiento del parásito.....	22
	2.11 Producción de leche.....	22
	2.12 Antecedentes de la neosporosis bovina.....	23
	2.13 Importancia del sistema de producción de leche en pequeña escala (SPLPE) en México.....	29
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	31
4.	JUSTIFICACIÓN.....	33
5.	HIPOTESIS.....	35
6.	OBJETIVOS.....	36
7.	METODOLOGÍA.....	37
	7.1 Localización.....	37
	7.2 Características del hato.....	37
	7.3 Muestreo para la determinación del estatus serológico mediante	

ELISA.....	38
7.4 Muestreo para la realización de la PCR.....	38
7.5 Medición de la producción de leche.....	39
7.6 Estimación del valor comercial de la leche.....	40
8. RESULTADOS.....	41
9. CONCLUSIÓN GENERAL.....	74
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
11. ANEXOS.....	89
11.1 Anexo I. Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas.....	89
11.2 Anexo II. Extracción de ADN de muestras sanguíneas.....	91
11.3 Anexo III. Extracción de ADN a partir de muestras de tejido fetal.....	93
11.4 Anexo IV. Extracción de ADN de placas de inmunofluorescencia..	94
Anexo V. Reacción en cadena de la polimerasa anidado.....	96

RESUMEN

Neospora caninum es un protozoario perteneciente al Phylum Apicomplexa, es el agente causal de la neosporosis bovina, enfermedad considerada actualmente como la principal causa de aborto bovino alrededor del mundo, esta enfermedad además de producir abortos genera disminución en la producción láctea, y en los parámetros productivos y reproductivos. El objetivo de la presente investigación fue detectar a *Neospora caninum* mediante PCR en sangre y asociar el serostatus frente al parásito con la producción láctea en bovinos de un hato perteneciente al SPLPE del municipio de Amecameca, Estado de México. Se estableció el estado serológico frente al parásito mediante ELISA al inicio del estudio y se registró la producción láctea de las hembras en producción semanalmente durante 36 meses para posteriormente comparar la exposición a *Neospora caninum* y determinar la asociación con la producción de leche. Por otra parte, se realizaron cinco muestreos de manera mensual y se colectaron muestras sanguíneas de la vena caudal por medio de tubos al vacío con anticoagulante para la obtención glóbulos blancos con la finalidad de determinar la presencia del parásito utilizando la técnica de PCR anidado con iniciadores previamente publicados, adicionalmente, fueron analizados tejidos fetales con el mismo protocolo; fueron secuenciados amplicones obtenidos y comparados con los reportado en el Genbank; finalmente, se calculó la concordancia entre las pruebas ELISA y PCR. De 37 vacas en las que se registró la lactancia completa, el 27 % fue seropositivo en un estudio previo; estimando un promedio de producción de 3,755.1 Kg. de leche por lactancia para el grupo de vacas seropositivas y de 4,390.9 Kg para las vacas seronegativas lo que representó 12.31 y 14.39 kg de leche/vaca/día; el valor de la producción de leche fue de \$22,530.00 pesos por lactancia para las vacas seropositivas y \$26,345.40 pesos para las seronegativas. Se estimó una seroprevalencia del 81.8 % a *Neospora caninum* en el hato por medio de ELISA; por su parte, el porcentaje de animales positivos al parásito mediante la prueba de PCR anidado fueron de 55.8, 94.1, 100, 97.1, 100 para los meses uno al cinco, respectivamente, promediando 89.4 % en el periodo estudiado. Con respecto al tiempo de gestación, fueron positivas 13, 16, 15, 13, 14, 13, 11, 10, 6 vacas desde el primero al noveno mes respectivamente; también, resultaron positivas 41 vacas no preñadas (nueve recién paridas), siendo de 88.0, 88.9, 87.9 % las prevalencias por cada tercio de gestación. Hubo un 91-96 % de homología en las secuencias de los amplicones respecto a lo publicado. El índice Kappa fue de $K= 0.41$ entre ELISA y PCR. Se concluye que las vacas seropositivas a *Neospora caninum* de un hato perteneciente al sistema de producción de leche en pequeña escala del municipio de Amecameca producen menor cantidad de leche que las vacas seronegativas; por otra parte, se demostró la presencia de *Neospora caninum* mediante PCR anidado.

Palabras clave: *Neospora caninum*, seroprevalencia, producción láctea, PCR

Abstract

Neospora caninum is a protozoan which belongs to the Phylum Apicomplexa, is the causal agent of bovine neosporosis, a disease considered currently the main cause of bovine abortion around the world, this disease besides producing abortions generates decrease in milk production and in the productive and reproductive parameters. The objective of the present investigation was to detect *Neospora caninum* by PCR in blood and to associate the serostatus with the parasite over a dairy production in cattle of a herd belonging to the SPLPE of the municipality of Amecameca, State of Mexico. The serological status against the parasite was established by ELISA at the beginning of the study and the milk production of the females in production was recorded weekly for 36 months to later compare the exposure to *Neospora caninum* and to determine the association with milk production. On the other hand, five samples were taken monthly and blood samples were collected from the caudal vein by means of vacuum tubes with anticoagulant to obtain white blood cells in order to determine the presence of the parasite using the nested PCR technique with primers previously published, in addition, fetal tissues were analyzed with the same protocol, amplicons obtained were sequenced and compared with those reported in Genbank; finally, the concordance between ELISA and PCR was calculated. Of 37 cows in which full breastfeeding was recorded, 27% were seropositive in a previous study; estimating an average of 3,755.1 kg of milk per lactation for the group of seropositive cows and 4,390.9 kg for the seronegative cows, which represented 12.31 and 14.39 kg of milk/cow/day. The value of milk production was \$ 22,530.00 pesos per lactation for seropositive cows and \$ 26,345.40 pesos for seronegative cows. A seroprevalence of 81.8% to *Neospora caninum* was estimated in the herd by ELISA; the percentage of positive animals to the parasite by the nested PCR test were 55.8, 94.1, 100, 97.1, 100 for months one to five, respectively, averaging 89.4% in the period studied. Regarding the gestation time, 13, 16, 15, 13, 14, 13, 11, 10, 6 cows were positive from the first to the ninth month respectively; 41 non-pregnant cows (nine in postpartum) were positive, with 88.0, 88.9, and 87.9% being the prevalences for each third of gestation. There was 91-96% homology in the amplicon sequences compared to what was published. The Kappa index was $K = 0.41$ between ELISA and PCR. It is concluded that cows seropositive to *Neospora caninum* from a herd belonging to the small-scale milk production system of the municipality of Amecameca produce less milk than the seronegative cows; On the other hand, the presence of *Neospora caninum* was demonstrated by nested PCR.

Key words: *Neospora caninum*, seroprevalence, milk production, PCR

1. INTRODUCCIÓN

La producción del ganado lechero puede verse afectada por diversos factores como son: mala calidad genética, alimentación deficiente o de baja calidad, manejo inadecuado, enfermedades metabólicas o infecciosas, así como un pobre desempeño reproductivo, entre otros. Con respecto al bajo desempeño reproductivo se encuentran principalmente errores en la detección del estro, baja fertilidad y el aborto, éste último definido como la pérdida del producto de la concepción entre los 42 y 260 días de la gestación (Rivera, 2001; Meléndez-Soto *et al.*, 2010). El aborto, es un signo clínico de numerosas enfermedades que afectan ya sea al feto, a la placenta, al aparato reproductor de la madre, o bien a causa de una enfermedad sistémica en la vaca; considerándose como el signo que más alarma causa entre los ganaderos, ya que sus ganancias se afectan negativamente, por la pérdida de fetos, la disminución de la producción láctea, así como por la baja fertilidad posterior, desecho prematuro, incremento en los costos de tratamientos, honorarios del médico veterinario, retraso en el programa de mejoramiento genético, etc. (Dailey, 2000; Córdova *et al.*, 2007). El origen del aborto puede ser no infeccioso o infeccioso, como ejemplo en los de causa no infecciosa se puede mencionar: problemas genéticos, nutricionales, manejo, traumatismos, intoxicaciones y problemas metabólicos; por su parte, entre los de naturaleza infecciosa con etiología viral están: Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Lengua Azul, Parainfluenza tipo 3, entre otras; por agentes bacterianos: Leptospirosis, brucelosis producida por *Brucella abortus*, Listeriosis producida por *Listeria monocytogenes* etc; micótico: *Aspergillus* sp., *Mucor* sp. etc. y finalmente, de origen parasitario como: *Tritrichomona foetus*, *Sarcocystis* sp. y *Neospora caninum*, éste último considerado como la principal causa de aborto bovino a nivel mundial en la actualidad (Dubey *et al.*, 2007, Adekunle e Ibikunle, 2013; Wilson *et al.*, 2016).

Neospora caninum es un protozooario perteneciente al Phylum *Apicomplexa*, agente causal de la neosporosis bovina, enfermedad que puede causar abortos entre el tercer y noveno mes de gestación aunque es más frecuente que ocurran entre el cuarto y sexto, además de causar reabsorción embrionaria, muerte fetal temprana,

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

mortinatos y muerte neonatal, provocando un efecto negativo importante en diferentes parámetros reproductivos y en la producción de leche; afecta principalmente al ganado lechero; sin embargo, el ganado productor de carne también sufre afectación por este parásito el cual ha sido reportado en gran parte del mundo (Dubey y Schares 2011; Donahoe *et al.*, 2015).

En México la neosporosis se considera dentro del grupo 3 (Artículo 4º del Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos) constituido por aquellas enfermedades que se encuentran presentes en territorio nacional consideradas como enzoóticas pero que representan un menor riesgo desde el punto de vista epidemiológico, económico, de salud pública y de comercio nacional e internacional y son de notificación mensual obligatoria a las autoridades competentes de sanidad animal del país (DOF 20/09/2007). En nuestro país fue reportada por primera vez por Morales y colaboradores (1997), posteriormente se reporta en varios Estados del país con diferentes resultados en la prevalencia, empleando distintos métodos diagnósticos como histopatología, inmunohistoquímica (IHQ), inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo inmunoenzimático (ELISA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tanto en ganado productor de leche, como en el destinado a la producción de carne, incluyendo principalmente sistemas de producción intensivos a gran escala, en los que las prevalencias encontradas van desde el 12 hasta el 72% (Guerrero, 2002; Morales *et al.*, 2001b); en contraste, en el sistema de producción de leche en pequeña escala (SPLPE) el cual abunda en el centro del país y de relevante importancia para la economía local, los estudios referentes a la neosporosis son escasos por lo que el objetivo del presente estudio fue detectar ADN de *Neospora caninum* en sangre de vacas del SPLPE a lo largo de la gestación, así como determinar su estado serológico frente al parásito y asociarlo con la producción láctea.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Agente etiológico, Variabilidad genética y Virulencia

Neospora caninum es un parásito protozoario intracelular obligado, perteneciente al Phylum *Apicomplexa* reconocido por primera vez en perros de Noruega que mostraron signología neurológica (Bjerkås, Mohn y Presthus, 1984); posteriormente, en 1988 el parásito fue aislado y descritos el género y especie (Dubey *et al.*, 1988). Este parásito pertenece a la Familia *Sarcosistidae* que agrupa taxonómicamente a otros protozoarios formadores de quistes como *Hammondia heydorni* y *Toxoplasma gondii*, con éste último guarda una relación muy estrecha ya que a pesar de ser inmunológica y estructuralmente diferente en el pasado fue confundido con éste gracias a su similitud morfológica y clínica (Dubey, 2003; Wilson *et al.* 2016). Era considerado como único en su género hasta la identificación de *Neospora hughesi* que ha sido descrito y aislado en caballos (Marsh *et al.*, 1998), es asociado con mioencefalitis fetal y aparentemente es transmitido de forma trasplacentaria como *Neospora caninum*, del cual puede ser fácilmente distinguido mediante el uso de técnicas moleculares (Goodswen *et al.*, 2013).

Existe un amplio número de aislados de *Neospora caninum* en el mundo, cada uno con características particulares atribuidas por la especie de origen y su estado clínico ya sea enfermo o aparentemente sano, algunos de ellos fueron natural o artificialmente infectados, además de la edad y otras peculiaridades inter e intraespecie que también influyen en las particularidades de dichos aislados, como la patogenicidad o virulencia. Han sido demostradas significativas variaciones en la virulencia y tasas de crecimiento en los diferentes aislados en animales experimentalmente infectados como gerbos, ratones, ovejas y bovinos; también existe evidencia de que los diferentes aislados pueden influenciar la respuesta inmune del hospedero y subsecuentemente la presentación de la infección (Al-Qassab *et al.*, 2010; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2014). Del mismo modo, han sido observadas diferencias en la expresión de inmunoglobulinas en ratones y vaquillas infectados con diferentes aislados de parásitos y esto al parecer está directamente ligado a la dinámica de la infección y presentación clínica; sin embargo, esta relación

aún no está claramente identificada (Donahoe *et al.*, 2015). La interpretación de los estudios comparativos entre los diferentes aislados de *Neospora caninum* son confundidos con algunos factores que pueden alterar la patogenicidad incluyendo el estadio del parásito usado para iniciar la infección, la ruta de inoculación, la dosis del inóculo y la posible mitigación de la virulencia además de otras características biológicas de los parásitos derivados del cultivo celular (Dubey y Schares, 2011; Al-Qassab *et al.*, 2010).

Por su parte, el uso de herramientas moleculares ha permitido orientar la investigación hacia la identificación de genes que pueden ser responsables de otorgar diferentes características a cada aislado, impactando de forma directa en la patogenicidad del mismo y la presentación de la enfermedad (Goodswen *et al.*, 2013). A la fecha, más de 100 aislados de *Neospora caninum* han sido analizados usando mini y micro satélites, los datos demuestran que estos parásitos tienen una población genéticamente diversa en todo el mundo; sin embargo, comparten características estructurales y ultra estructurales (Donahoe *et al.*, 2015).

Respecto a la patogenicidad de *Neospora caninum*, hasta el momento se considera que no existe un modelo animal adecuado para probar la variación de los aislados, ya que en ciertos estudios se reportan variaciones en la patogenicidad del parásito en ratones, otra complicación es el uso de diferentes estadios; además, muchos aislados de *Neospora caninum* son mantenidos en cultivo celular y los pases prolongados del cultivo pueden alterar la patogenicidad y otras características de estos aislados como sucede con los virus por ejemplo (Bartley *et al.*, 2006).

2.2 Hospederos

En el ciclo de vida de *Neospora caninum* participan caninos como hospederos definitivos en los que se lleva a cabo la replicación sexual, entre los hospederos de este parásito se han identificado al coyote (*Canis latrans*) (Gondim *et al.*, 2004a), el dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (King *et al.*, 2010) y el lobo gris (*Canis lupus*) (Dubey *et al.*, 2011) en el ciclo silvestre y el perro (*Canis familiaris*) en ambiente doméstico, que también funge como hospedero intermediario; con respecto a los hospederos intermediarios en los cuales se lleva a cabo la replicación asexual es

reportada una gran cantidad entre los que se encuentran principalmente a los bovinos, caprinos, ovinos, equinos (Dubey *et al.*, 2007) y aves domésticas (Costa *et al.*, 2008).

Asimismo, en los últimos años diversos estudios reportan infección por *Neospora caninum* en una amplia gama de hospederos silvestres, entre los caninos se ha mencionado a los zorros, lobos, chacales, perro salvaje africano; así como a algunos felinos como el lince, el chita y el león; otros carnívoros como el oso negro, la hiena manchada y el mapache, y otros grupos animales como los cérvidos, roedores, mamíferos marinos, marsupiales, entre otros, además de humanos, en algunos de ellos ha sido posible demostrar por medio de histopatología la presencia del parásito o amplificación de ADN; sin embargo, sólo en unos pocos ha sido posible aislar al parásito, lo cual significa que la detección de ADN o anticuerpos no garantiza encontrar viable a *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 2007; Donahoe *et al.*, 2015).

2.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Neospora caninum* es muy semejante al de *Toxoplasma gondii*, son conocidos tres estadios infectivos, taquizoitos, bradizoitos en quistes tisulares y esporozoitos dentro de ooquistes esporulados. Los taquizoitos se encuentran en hospederos intermediarios y ocurren intracelularmente (Dubey *et al.*, 2002), son una fase infectiva de rápida multiplicación, presentan forma ovoide, de 2 por 6 μm , se dividen por endodiogenia de forma rápida dentro de la célula que parasita; se ha encontrado en células nerviosas, fibroblastos, endotelio vascular, miocitos, células epiteliales, túbulos renales y hepatocitos, incluyendo células mononucleares que probablemente ayudan al parásito en su propagación sirviendo como transporte (Dubey *et al.*, 2002; Hemphill *et al.*, 2006). Durante la fase aguda de la enfermedad los taquizoitos pueden ser localizados virtualmente en todos los tejidos del hospedero y es durante este estadio que los ciclos de replicación intracelular lisan las células infectadas, liberando taquizoitos que invaden a células circundantes lo que produce la formación de lesiones y en algunos animales la enfermedad clínica (Dubey *et al.*, 2007). Se estima que en un hospedero inmunocompetente los

taquizoitos se replican unas 20 veces antes de su diferenciación a bradizoitos, siendo éste el estadio de reposo del parásito, que bajo presión del sistema inmune del hospedero forma un quiste tisular (Goodswen *et al.*, 2013).

Los quistes tisulares que contienen generalmente bradizoitos también se encuentran en hospederos intermediarios, tienen forma redonda u ovalada de aproximadamente 107 μm de largo, son encontrados principalmente en el SNC pero también se localizan en músculo estriado; sus paredes son de más de 4 μm de grosor y pueden medir 7-8 por 2 μm siendo muy similares a los taquizoitos pero difiriendo de éstos en el número de roptrias y por su lenta replicación (Figura 1), ambos forman parte de la fase asexual de reproducción (Dubey *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2007). Los bradizoitos permanecen enquistados gracias a factores inmunológicos relacionados con el hospedero, permitiendo así la permanencia del parásito por largo tiempo y una infección crónica asintomática (Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011). La recrudescencia de la enfermedad puede ocurrir gracias a cambios en el estado inmunológico del hospedero, la inmunodepresión puede resultar en la reactivación de los bradizoitos y su conversión a taquizoitos (Hemphill *et al.*, 2006) lo cual se ha demostrado que ocurre en hembras gestantes y permite a los taquizoitos migrar a otros tejidos incluida la placenta y provocar la posible infección del feto (Williams *et al.*, 2009).

Los quistes tisulares son difícilmente estudiados *in vivo* debido a que es complicado encontrarlos en animales naturalmente infectados; existen modelos animales como los ratones (Mc Guire *et al.*, 1997a, b) y gerbos (Gondim *et al.*, 2001), que desarrollan relativamente pocos quistes tisulares. Recientemente, se demostró que algunos carnívoros marsupiales conocidos como ratones marsupiales de cola gorda (*Sminthopsis crassicaudata*) desarrollan extensamente dichos quistes cuando se inoculan experimentalmente, lo cual será de gran ayuda en el estudio de la formación de estos quistes (King *et al.*, 2011).

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

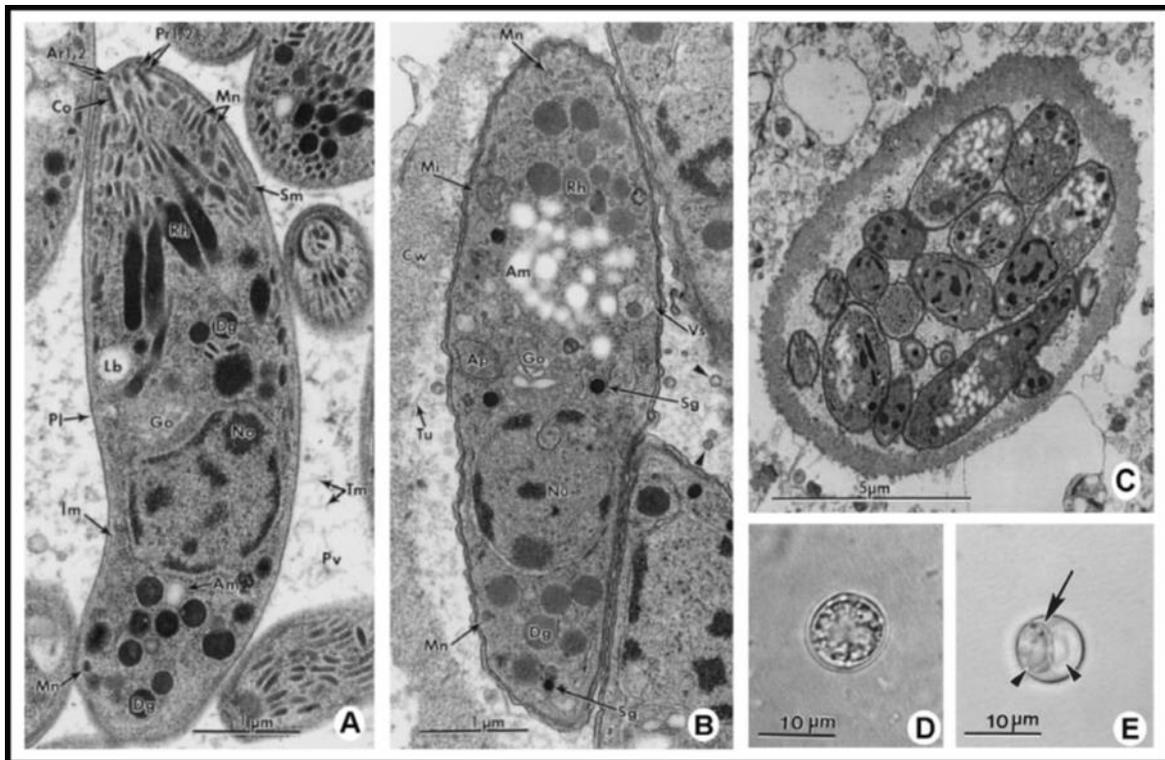


Figura 1. Estructura de *Neospora caninum* (A) taquizoito, (B) bradizoito, (C) quiste tisular, (D) ooquiste no esporulado y (E) ooquiste esporulado. Tomado de Goodswen *et al.*, 2013.

La fase sexual de la reproducción se lleva a cabo en el hospedero canino, los ooquistes son excretados sin esporular en las heces de perros y otros caninos que fungen como hospederos definitivos y/o intermediarios (Gondim *et al.*, 2004b), estos ooquistes esporulan fuera del hospedero en aproximadamente 24 horas (Lindsay *et al.*, 1999) ingresando al nuevo hospedero por vía oral, los esporozoitos desenquistan y se alojan en el epitelio intestinal desarrollando al menos una esquizogonia antes de generar la gametogonia surgiendo una nueva generación lista para ser excretada como ooquiste (Figura 2). Las gruesas paredes de estos ooquistes soportan el congelamiento y la desecación, pueden permanecer viables en el ambiente por largos periodos de tiempo, ya esporulados contienen dos esporozoitos con cuatro esporozoitos cada uno (Dubey *et al.*, 2002).

Los caninos también pueden ser infectados mediante el consumo de tejidos que contengan quistes de taquizoitos o bradizoitos liberando esporozoitos que se alojan

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

en el intestino (Mc Allister *et al.*, 1998), los hospederos intermediarios son infectados mediante la ingestión de ooquistes esporulados que contaminan el alimento y agua de bebida, cerrando de esta manera el ciclo de vida del parásito (Dubey, 2003).

Los ooquistes son la clave de la epidemiología de *Neospora caninum* a pesar de que poco se sabe de la biología de los mismos, los perros excretan ooquistes a partir del día cinco post ingestión de tejidos de animales infectados natural o artificialmente y la cantidad de ooquistes excretados así como la duración del proceso es muy variable (Dubey *et al.*, 2007) también ha sido propuesto que los animales inmunocomprometidos o esplenectomizados excretan más ooquistes que los animales sanos (Lindsay *et al.*, 1999; Lindsay *et al.*, 2001), de igual modo los cachorros eliminan más ooquistes que los perros adultos (Dubey *et al.*, 2007).

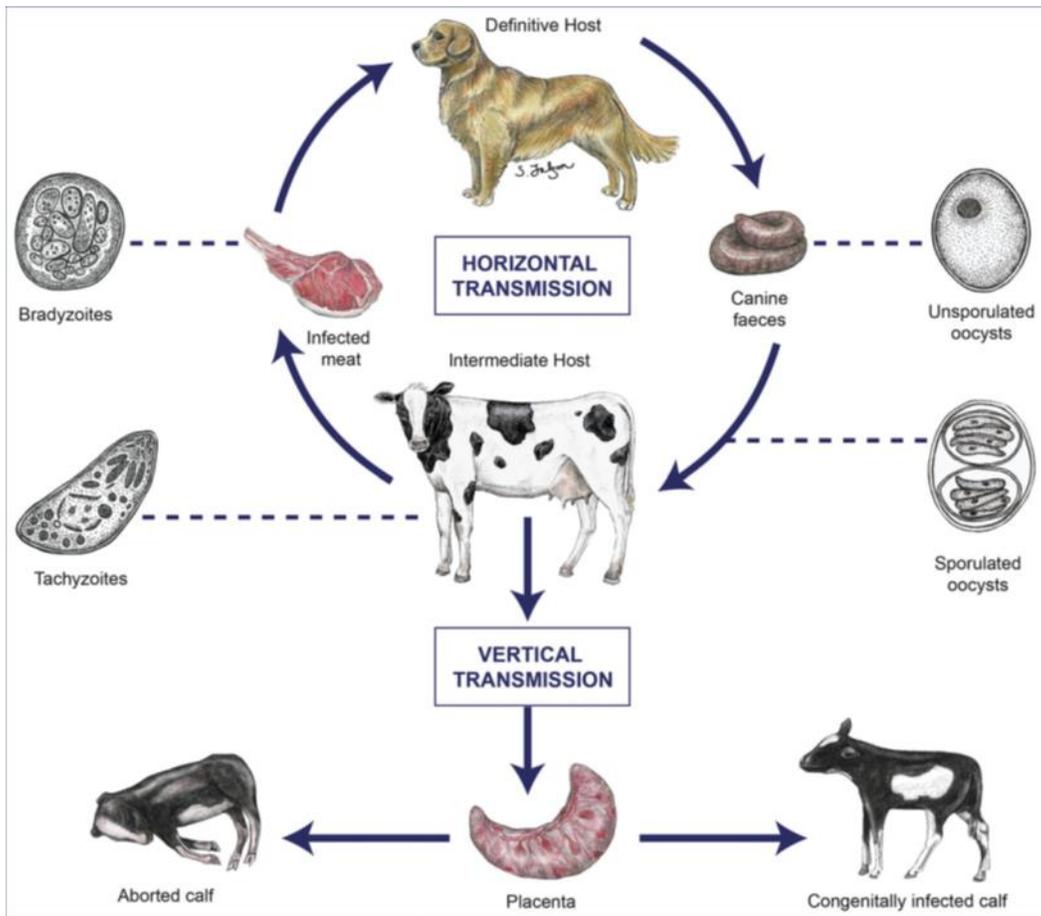


Figura 2. Ciclo de vida de *Neospora caninum*, tomado de Goodswen *et al.*, 2013.

2.4 Transmisión

Neospora caninum puede ser transmitido horizontalmente por la ingestión de tejidos con taquizoitos o quistes tisulares, también por ingestión de comida o agua de bebida contaminada con ooquistes esporulados (Dubey *et al.*, 2007).

No hay evidencia de que los ooquistes sean eliminados en las heces de vacas asintomáticas adultas, por lo que no ha sido observada la transmisión de vaca a vaca, la única forma de infección natural del ganado demostrada después del nacimiento, es la ingestión de ooquistes esporulados del ambiente (Gondim *et al.*, 2004b), dicha transmisión posnatal en la práctica aparenta ocurrir raramente de forma natural (Hall *et al.*, 2005), aunque ésta comprensión del ciclo de vida es inconsistente con la amplia distribución y aparente alta prevalencia de infecciones en la naturaleza (Al-Qassab *et al.*, 2010).

Además, puede ser transmitido de forma trasplacentaria también llamada transmisión vertical o congénita de una madre infectada a su feto durante la preñez, ésta es la principal vía de transmisión de la enfermedad, *Neospora caninum* es uno de los organismos con mayor capacidad de transmisión vertical en el ganado vacuno, hasta un 95% de los terneros pueden nacer infectados verticalmente en una misma explotación y el parásito puede pasar de la madre al feto durante varias generaciones, las hembras infectadas serán positivas durante toda su vida, teniendo más probabilidades de aborto al llegar a adultas, contribuyendo a mantener la infección en la explotación (Dubey *et al.*, 2007), los abortos y la infección en general pueden repetirse en un mismo animal (Almería y López-Gatius, 2009) y la mayoría de los terneros nacidos de madres seropositivas son clínicamente normales, pero presentan anticuerpos frente a *Neospora caninum* antes de la toma de calostro (Dubey *et al.*, 2007).

Se considera que hay esencialmente dos escenarios para la transmisión trasplacentaria de *Neospora caninum* para infectar al feto; en primer lugar, la transmisión de tipo exógena que ocurre después de la infección primaria de una madre durante la preñez; por ejemplo, la infección derivada de la ingestión de un ooquiste y en segundo término, la transmisión endógena que es cuando la madre

adquirió la infección antes de la preñez, como ejemplo, una madre crónicamente infectada en la cual ha ocurrido la recrudescencia de la enfermedad (Trees y Williams, 2005), dicha recrudescencia es la reactivación de la enfermedad en ganado preñado, seguido de transmisión a través de la placenta. Poco se conoce acerca de la recrudescencia de la infección y la frecuencia con que esto ocurre en ganado no preñado (Goodswen *et al.*, 2013).

Por otro lado, algunos autores consideran poco probable la transmisión lactogénica en condiciones naturales (Dijkstra *et al.*, 2001); sin embargo, ha sido demostrada la presencia de ADN de *Neospora caninum* en calostro de vacas infectadas (Moskwa *et al.*, 2007), en leche de vacas seropositivas a partir de la cual fue posible infectar terneros recién nacidos de forma artificial (Moskwa *et al.*, 2003), y hasta una semana después del nacimiento (Davison *et al.*, 2001), sugiriendo que se debe tomar en consideración esta posible vía de transmisión.

Con respecto a la transmisión sexual de *Neospora caninum*, se han llevado a cabo varios estudios en diferentes partes del mundo, revelando la presencia de ADN del parásito en semen de toros naturalmente infectados (Ferre *et al.*, 2005), también se detectó ocasionalmente ADN del parásito en extendidos congelados de semen de toros infectados naturalmente (Caetano da Silva *et al.*, 2004), y fue posible infectar vaquillas inseminadas artificialmente con semen conteniendo 10^7 (diez millones) de taquizoitos vivos de *Neospora caninum*, las vaquillas seroconvirtieron positivamente y fue posible detectar ADN en la sangre, razón por la cual esta vía de transmisión también se debe tomar en cuenta ya sea para futuros estudios o como riesgo de infección (Serrano *et al.*, 2006).

2.5 Distribución de la enfermedad

La neosporosis bovina es una enfermedad cosmopolita, detectada desde los países con más producción lechera y altamente tecnificados como Estados Unidos hasta países con menor producción como México, en el cual ha sido reportada en cuencas lecheras como las del centro norte del país hasta explotaciones con menos de 20 animales.

Desde 1989 *Neospora caninum* ha sido encontrado en cada país en el que se han realizado estudios para detectar a dicho parásito en ganado (Al-Qassab *et al.*, 2010); es decir, se espera que *Neospora caninum* se encuentre en cualquier lugar donde el ganado exista (Goodswen *et al.*, 2013). Existen reportes de seroprevalencia contra el parásito en los cinco continentes, con respecto Oceanía, específicamente en Australia se describen prevalencias que oscilan entre el 10 y el 24% en ganado productor de leche (Haerdi *et al.*, 2006; Atkinson *et al.*, 2000) y en ganado productor de carne de 14.9% (Stoessel *et al.*, 2007); en Nueva Zelanda entre el 22 y el 100% (Reichel, 1998; Antony y Williamson, 2003) de los caninos presentaron anticuerpos contra *Neospora caninum*. En Asia, investigaciones realizadas mediante inmunofluorescencia reportan seroprevalencia de 1.5 % en ganado de carne en Japón (Koiwai *et al.*, 2005), 44.9% en bovinos productores de leche pertenecientes a Taiwán con la misma prueba (Ooi *et al.*, 2000), de 23% con ELISA en Corea (Bae *et al.*, 2000), mientras que en perros de Japón la seroprevalencia fue de 21.6% para los caninos pertenecientes a granjas lecheras y de 8.3% para los pertenecientes a zonas urbanas con la prueba IFI (Kim *et al.*, 2003). Respecto al continente africano, han sido reportadas prevalencias de 2.8% en ganado nigeriano (razas indígenas) (Adekunle y Ibikunle, 2013), con ganado lechero en producción semi intensiva en Marruecos la seroprevalencia fue de 8.52% (Lucchese *et al.*, 2016) ambas con la prueba ELISA, mientras que usando inmunofluorescencia la seroprevalencia obtenida en perros de zonas rurales Kenianas fue de 0% (Barber *et al.*, 1997). En el continente Europeo las seroprevalencias van desde el 0.5% en Suecia (Bartels *et al.*, 2006) y República Checa (Bártová *et al.*, 2015), hablando de caninos, se describen seroprevalencias que comprenden desde de 1.3 % con la prueba ELISA en la Republica Checa (Koudela *et al.*, 1998) al 46.4 % con la misma prueba en Bélgica (Lasri *et al.*, 2004), en el ganado productor de carne se publicaron seroprevalencias entre el 4.1 % en Francia con la técnica ELISA y el 14.9 % utilizando inmunofluorescencia (Dubey *et al.*, 2007). En tanto que en la Península Ibérica, la seroprevalencia en Portugal determinada a través del uso de ELISA fue de 40% en ganado lechero (Thompson *et al.*, 2001). Por último, en América se han reportado seroprevalencias por todo el

continente, desde Canadá con 9% con ganado de carne (Waldner *et al.*, 2001) y 18.5% en ganado lechero con la técnica ELISA (Scot *et al.*, 2006) hasta Argentina con 64.5 % en vacas lecheras empleando inmunofluorescencia (Venturini *et al.*, 1999), 4.9% en bovinos productores de carne (Moore *et al.*, 2003), mientras que en perros de hatos lecheros la seroprevalencia fue 48.0%, 54.2% para los encontrados en hatos productores de carne y de 26.2% para los de zonas urbanas (Basso *et al.*, 2001).

Por otra parte, el aislamiento de *Neospora caninum* también ha sido posible en diversas partes del mundo, ya sea de hospederos definitivos, intermediarios o animales silvestres, a partir de diversos tejidos. En Australia a partir de piel de un perro adulto (Mc Innes *et al.*, 2006b), Estado Unidos de América del cerebro de un venado adulto (Vianna *et al.*, 2005), Brasil de un búfalo de agua adulto (Rodríguez *et al.*, 2004), Malasia del cerebro de un becerro recién nacido (Cheah *et al.*, 2004), Nueva Zelanda de cerebro de una vaca adulta (Okeoma *et al.*, 2004b), entre otros.

2.6 Signología

Actualmente pocos signos han sido reportados en la neosporosis bovina, cuya manifestación más notable es el aborto (Dubey *et al.*, 2007); la mayoría de las vacas preñadas tienen gestaciones normales; sin embargo, las vacas infectadas tienen más probabilidades de abortar que las no infectadas, especialmente si las primeras se infectan en la preñez temprana (Goodswen *et al.*, 2013). Se ha observado que el ganado adulto infectado con *Neospora caninum* no exhibe signos clínicos de la enfermedad, el único signo físico reportado en adultos serológicamente positivos ha sido la pérdida de peso en ganado de carne (Barling *et al.*, 2000a), también han sido descritos becerros con signología neurológica congénita que tienden a ser delgados, de talla pequeña, con dificultad para mantenerse en pie y con pobre balance dificultando mantener el equilibrio (Goodswen *et al.*, 2013); asimismo, pueden presentar hiperextensión o flexión de los miembros anteriores o posteriores, exoftalmia y estrechamiento de la médula espinal. El hallazgo patológico predominante a la necropsia en estos animales es la encefalitis mononuclear y las lesiones son detectables más frecuentemente en médula espinal que en cerebro;

de igual manera, es más común detectar quistes en los tejidos que taquizoitos y las lesiones fuera del SNC son poco frecuentes pero se puede presentar miositis, nefritis y neumonía (Dubey *et al.*, 2006; Dubey y Schares, 2006).

Por otra parte, el diagnóstico de los abortos asociados a *Neospora caninum* y neosporosis bovina usualmente se hace mediante patología (Buxton *et al.*, 2002) y se ha encontrado a la encefalitis no supurativa como signo patognomónico de esta enfermedad (Goodswen *et al.*, 2013), también pueden presentarse hidrocefalia, hipoplasia cerebelar y medular, necrosis y microgliosis, miocarditis multifocal no supurativa, miositis, hepatitis periportal no supurativa con necrosis hepática variable y nefritis intersticial no supurativa (Dubey *et al.*, 2006; Dubey y Schares, 2006). La presencia de quistes y taquizoitos dentro de estas lesiones es inconsistente y puede ser complicado detectarlos con técnicas comunes como la tinción hematoxilina/eosina; por el contrario, el uso de la técnica de inmunohistoquímica puede facilitar la identificación del parásito. Es más frecuente encontrar quistes y taquizoitos en cerebro y médula espinal; aunque, si es que éstos están presentes se pueden reconocer también en miocitos, la placenta puede estar histológicamente normal o presentar áreas de necrosis cotiledonaria asociada con inflamación mononuclear y ocasionalmente grupos de taquizoitos dentro de los trofoblastos (Donahoe *et al.*, 2015).

2.7 Inmunidad

A diferencia de *Toxoplasma gondii*, que induce una respuesta inmune protectora frente al primer contacto con el agente, en el caso de *Neospora caninum* esto no ocurre, o sucede en menor grado (Williams *et al.*, 2003).

Un tema recurrente en cuestión para entender de la neosporosis bovina, es por qué solo una proporción de las vacas preñadas infectadas sufren abortos y por qué no todos los becerros nacidos de madres infectadas son congénitamente infectados. Se ha incrementado la evidencia que sugiere que el resultado de una infección está inexplicablemente ligada al momento preciso de la gestación en el cual dicha infección se lleva a cabo y el estado inmunológico de la madre y del feto (Goodswen *et al.*, 2013), así como la virulencia del aislado infectante (Dubey *et al.*, 2006). Se

ha descrito la participación del interferón gamma (IFN- γ), de inmunoglobulinas de tipo G y células T cooperadoras, lo cual indica que la inmunidad celular y humoral responden en un intento por controlar la infección por *Neospora caninum* (Serrano *et al.*, 2006, Serrano-Martínez *et al.*, 2007, Goodswen *et al.*, 2013).

Después de una infección primaria el IFN- γ activa una respuesta pro inflamatoria de macrófagos y otras células mononucleares que se cree induce la diferenciación de taquizoitos a bradizoitos y la formación y mantenimiento de quistes tisulares (Williams *et al.*, 2009), esta diferenciación juega un papel muy importante en la recrudescencia y establecimiento de la infección crónica (Lyons *et al.*, 2002). Es bien conocido que la recrudescencia de la infección ocurre en la vacas preñadas debido a que el sistema inmunológico se encuentra disminuido y se especula que la inmunomodulación de la madre para evitar el rechazo al feto da oportunidad a los taquizoitos de atravesar la barrera trasplacentaria y llegar al feto (Quinn *et al.*, 2004). Con el objeto de controlar la diseminación de taquizoitos posterior a la infección primaria o recrudescencia, es probable que la respuesta pro inflamatoria mediada por células sea modificada como la principal protección para el hospedero (Williams y Trees, 2006). La inmunomodulación durante la preñez y en particular la respuesta Th1 de la madre parecen favorecer la sobrevivencia y multiplicación de *Neospora caninum* y dificultar la supervivencia del feto (Goodswen *et al.*, 2013), dicha supervivencia depende de la inmunocompetencia del feto y ésta a su vez del momento de la infección (Innes *et al.* 2002); es decir, el feto es más vulnerable en el primer tercio de la gestación que en los siguientes dos tercios, ya que el sistema inmunológico se desarrolla progresivamente a lo largo de los 280 días de gestación; en otras palabras, en la gestación temprana antes de los 100 días de gestación cuando el timo, bazo y nódulos linfáticos periféricos son inmaduros el feto es sumamente vulnerable presentando reabsorción embrionaria o aborto en el caso de recrudescencia o infección primaria; para el segundo tercio de la gestación antes de los 180-200 días, los órganos y tejidos del sistema inmune fetal empiezan a reconocer, aunque de manera rudimentaria, a microorganismos pero de forma ineficiente para la supervivencia del feto presentando en este periodo el mayor número de abortos y para el último tercio de gestación, el incremento en la

inmunocompetencia produce la supervivencia del feto dando origen a un becerro clínicamente normal pero persistentemente infectado si la recrudescencia se da en este periodo o un aborto en el caso de una infección primaria (Goodswen *et al.*, 2013).

Se considera que la primer línea de defensa en contra de patógenos invasores es mediada por células natural killer (NK), y se ha demostrado que las células NK bovinas tienen la habilidad de lisar fibroblastos infectados, inhibir el crecimiento de taquizoitos y producir interferón gamma (Klevar *et al.*, 2007); esta producción de interferón puede proveer las citosinas necesarias en el ambiente para la activación de una respuesta adaptativa del sistema inmune de tipo Th1, con lo cual se ha demostrado que en ganado infectado produce una respuesta tipo Th1 asociado con la activación de células CD4 y producción de IFN- γ . De acuerdo con algunos autores la producción de IFN- γ durante la preñez es efectiva para prevenir el aborto en ganado naturalmente infectado (Almería *et al.*, 2009; López-Gatius *et al.*, 2007); en contraste, se refiere que puede ser perjudicial debido a que es altamente inflamatorio y puede provocar daño a la placenta, lo que ha llevado a considerarlo como posible causa de aborto en la gestación temprana (Maley *et al.*, 2006; Quinn *et al.*, 2002) y media gestación (Almería *et al.*, 2010), del mismo modo fue demostrada la importancia de las células CD4, ya que tienen la capacidad de eliminar las células infectadas con *Neospora caninum* (Staska *et al.*, 2003).

Con respecto a la inmunidad del feto, ha sido detectada una respuesta de anticuerpos específicos contra *Neospora caninum* en fetos de al menos 100 días de gestación (Bartley *et al.*, 2012); por otra parte, fueron observadas respuestas celulares mitogénicas después de 12 semanas de gestación en células sanguíneas y después de 14 semanas en el timo y bazo (Innes *et al.*, 2005). La infección en la preñez temprana fue asociada con la diseminación del parásito y lesiones necróticas específicas atribuidas al mismo, pero sin detectar reacciones inflamatorias (Macaldowie *et al.*, 2004); mientras que la infección en la preñez media y tardía resultó en menos lesiones y reducción de la diseminación del parásito de igual modo sin el hallazgo de inflamación (Maley *et al.*, 2003) lo que sugiere que la respuesta

inmune del feto es la responsable de la presentación de la infección más que la respuesta inflamatoria materna; sin embargo, es elemental tener presente que la respuesta inmune de la madre juega un papel muy importante en la infección (Monney y Hemphill, 2014).

A pesar del conocimiento que se posee sobre *Neospora caninum*, desde el punto de vista inmunológico es difícil definir parámetros exactos de la respuesta humoral que sucede en animales naturalmente expuestos. Algunos autores reportan que altos niveles de anticuerpos están asociados con altos niveles de abortos (Yanis *et al.*, 2010); en contraparte, en otros estudios se propone que son protectores contra abortos subsecuentes (Anderson *et al.*, 1995; Dijkstra *et al.*, 2003); también se sabe que los niveles de anticuerpos no son constantes ya que fluctúan a lo largo de la infección y pueden estar dirigidos a taquizoitos en una infección aguda, ser muy pocos e indetectables al inicio de la infección o bien, producidos contra bradizoitos en una infección crónica, siendo importante mencionar que las principales pruebas empleadas en el diagnóstico serológico están diseñadas para detectar anticuerpos contra taquizoitos (Monney y Hemphill, 2014).

2.8 Abortos endémicos, epidémicos y esporádicos

Los abortos en bovinos asociados a *Neospora caninum* pueden tener diferentes patrones, lo que en general lleva a clasificarlos en abortos epidémicos y esporádicos. En el caso de los abortos epidémicos, a los que también se les denomina tormentas de abortos, si estos son temporales y si 15 % de las vacas en riesgo aborta dentro de un periodo de 4 semanas; o bien, si 12.5 % de estas aborta dentro de 8 semanas, y para otros autores cuando el 10% de las vacas abortan dentro de 6 semanas (Moen *et al.*, 1998, Wouda *et al.*, 1999, Schares *et al.*, 2002), este tipo de abortos se pueden asociar a una infección primaria de madres jóvenes probablemente por ingestión de agua o comida contaminada con ooquistes, también por la reingestión de dicha comida, ya que estas pueden ser expuestas a comida contaminada varias veces dentro de la misma gestación y como resultado los abortos pueden ocurrir en un corto periodo de tiempo. La variabilidad observada en los abortos epidémicos debida a una primera infección se puede modificar por

algunos factores como la patogenicidad de la cepa, la cantidad de ooquistes ingeridos y la susceptibilidad de la madre, es decir, el estado inmunológico o la etapa de gestación en la que se encuentre. El problema de aborto es considerado endémico si persiste en el hato de forma intermitente por un largo periodo de tiempo, este es debido a la constante infección de madres que la transmiten vía trasplacentaria o vertical a su descendencia (Hall *et al.*, 2005); es de suponer que en este caso la infección por vía horizontal debe ser baja o nula. Finalmente, con respecto a los abortos esporádicos, estos ocurren sólo de forma ocasional dentro del hato.

2.9 Factores de riesgo, temporalidad y espacio

De acuerdo a lo mencionado por Dubey y colaboradores (2007) sólo se pueden obtener datos concluyentes de estudios prospectivos con corte experimental no obstante, también sostienen que la repetida identificación del mismo factor de protección o riesgo en estudios independientes incrementa la evidencia de que dicho factor sea un verdadero factor de riesgo o protección frente a la infección o la enfermedad, razón por la cual es importante aclarar que existen diferencias serológicas y epidemiológicas entre los reportes realizados en los diferentes países en los cuales se han hecho estudios y el tipo de ganado bajo estudio; además de esto, en dichas investigaciones varían las técnicas de diagnóstico, tamaño de muestra y diseño de estudio empleados (Dubey *et al.*, 2007).

Entre los factores de riesgo que asocian a las condiciones climatológicas con la infección, seroprevalencia o abortos, se puede mencionar la lluvia, esto se supone está relacionado con los descensos de la temperatura, la calidad de los alimentos y dificultad para el mantenimiento de la higiene (López-Gatius *et al.*, 2005); también el número de ooquistes ingeridos por la madre y el tercio de gestación en el que se encuentre (Gondim *et al.*, 2004b). Otro de los factores relacionados es la humedad relativa, en un estudio se demostró que un aumento en los días acumulados con humedad inferior al 60% durante el segundo semestre de gestación incrementó el riesgo de aborto, de igual modo, una acentuación en el régimen de lluvias durante el segundo semestre de gestación tuvo el mismo efecto (Yanis *et al.*, 2010). Aunado

a esto, algunos estudios describen aumento en la seropositividad en primavera (Barling *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2007; Ghalmi *et al.*, 2012).

Los factores climáticos como la lluvia o las altas temperaturas parecen tener un efecto positivo sobre la esporulación de los ooquistes de *Neospora caninum* y su diseminación, así como de la transmisión horizontal de la enfermedad (Almería y López-Gatius, 2009). Otra explicación está orientada a considerar que estas condiciones de clima promueven la proliferación de hongos y bacterias, afectando al ganado y provocando que el sistema inmunológico no sea capaz de proteger adecuadamente al sujeto, con lo cual pueda tener lugar una reactivación de la infección en los animales infectados crónicamente (Dubey *et al.*, 2007).

Por otro lado, y considerando el estatus serológico a *N. caninum* el riesgo relativo de aborto en vacas seropositivas fue de entre 12 y 19 veces superior comparado con las vacas seronegativas (López-Gatius *et al.*, 2004), mientras que en otro estudio se reportó que es de 3 a 27 veces superior (Nogareda *et al.*, 2007).

Los hallazgos recientes han llevado a que hoy en día se acepte la idea de que la presencia de perros dentro de la granja incrementa el riesgo de infección del ganado, debido a que los perros como hospederos definitivos aumentan la posibilidad de infección posnatal de los bovinos mediante la ingestión de ooquistes en alimento o agua contaminados, lo cual está directamente relacionado a las prácticas de alimentación empleadas; por otra parte, se ha observado que las prácticas de alimentación hacia los caninos en cada granja están íntimamente relacionadas con la posibilidad de seropositividad dentro del hato, debido al posible consumo de fetos abortados o placentas por los caninos (Dubey y Schares, 2011; Dubey *et al.*, 2007; Ghalmi *et al.*, 2012).

Otro de los factores de riesgo identificado de forma repetitiva es la detección de anticuerpos contra otros agentes etiológicos de origen viral principalmente, como Diarrea viral bovina (Ojeda *et al.*, 2016) y Rinotraqueítis infecciosa bovina (Dubey y Schares, 2011).

Respecto a la densidad poblacional, se considera que los ranchos con elevado número de ganado pueden utilizar sistemas de alimentación alternativos que pueden elevar el riesgo de transmisión horizontal, como el pastoreo a través del consumo de alimento y agua contaminada por hospederos definitivos en regiones con alta presencia de caninos silvestres (Barling *et al.*, 2000b)

2.10 Diagnóstico

Desde el primer aislamiento de *Neospora caninum* han sido desarrollados un amplio rango de ensayos para detectar la infección en perros, ganado y otras potenciales especies hospederas; han sido utilizadas técnicas directas e indirectas, éstas últimas son mayormente empleadas como pruebas de escrutinio para el análisis poblacional principalmente por su fácil manejo y la posibilidad de manipular un número amplio de muestras, se basan en la detección de anticuerpos circulantes ya sea en leche, suero o plasma sanguíneo de animales adultos o fetos inmunocompetentes, cabe recordar que el hallazgo de anticuerpos en un animal sólo refleja la exposición al agente en algún momento determinado de su vida; en contraste, las pruebas de diagnóstico directas son aquellas con las que se evidencia la presencia del agente o ADN del mismo (Yao *et al.*, 2009).

Entre los ensayos inmunológicos más frecuentemente utilizados se encuentran:

2.10.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Esta técnica se basa en la propiedad del fluorocromo unido a una anti-globulina (conjugado) para fluorescer bajo el microscopio de epifluorescencia. Si existe la presencia de anticuerpos (inmunoglobulinas) en el suero problema, se unirán de manera específica al antígeno, generalmente en esta prueba son empleados taquizoítos de *Neospora caninum* los cuales están fijados en la laminilla, posteriormente el conjugado se une a la inmunoglobulina (IgG) presente en el suero problema. Fue la primera técnica serológica utilizada para el diagnóstico de *Neospora caninum*, y se encuentra disponible de forma comercial; al igual que todas las pruebas tiene varias desventajas: el costo, disponibilidad, y bajo número de muestras para procesar por laminilla, son algunos ejemplos (Almería, 2013).

2.10.2 Ensayo inmunoenzimático (ELISA). El principio de esta prueba es la capacidad del conjugado (anti globulina/enzima) de reaccionar con el sustrato dando color a la reacción la cual se puede medir en un espectrofotómetro. El antígeno (taquizoito) se encuentra adherido al fondo del pocillo de la placa de prueba, es expuesto al suero problema y éste al conjugado, para finalmente, añadir el sustrato y así poder observar color en proporción a la cantidad de anticuerpos presentes en el suero. Por su alta sensibilidad y especificidad, aunado a su simplicidad es la prueba más utilizada para el diagnóstico serológico (Almería, 2013); está disponible de forma comercial presentando los inconvenientes del elevado costo y disponibilidad pero con la ventaja de poder manipular un buen número de muestras por placa.

Además de estas pruebas, son empleadas en menor grado la aglutinación y el inmunoblot (Almería, 2013).

2.10.3 Histopatología. Este método cuenta con baja sensibilidad para la detección de organismos comparada con otras pruebas disponibles, debido a que las lesiones no siempre están presentes o no pueden ser fácilmente observables en la sección de tejido elegida (Dubey y Schares, 2006); la encefalitis no supurativa es considerada como signo patognomónico de esta enfermedad (Goodswen *et al.*, 2013), mientras que los tejidos mayormente utilizados son el encéfalo y médula espinal (Donahoe *et al.*, 2015); sin embargo, esta sigue siendo una buena herramienta para el diagnóstico de la infección, pero no por sí sola.

2.10.4 Inmunohistoquímica. Esta prueba puede facilitar el diagnóstico con el uso de anticuerpos específicos a *Neospora caninum*, generalmente se emplean anticuerpos policlonales, ya que éstos exhiben mayor sensibilidad al detectar los antígenos cuando están presentes (Dubey y Schares, 2006; Dubey *et al.*, 2007). Comúnmente esta prueba es usada en conjunto con la histopatología; sin embargo, al igual que las pruebas indirectas, los ensayos comerciales de este tipo sólo están diseñados para la detección de taquizoitos y al igual que la prueba anterior sólo para diagnóstico *posmortem*.

2.10.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Gracias a la capacidad que tiene la enzima polimerasa de copiar fragmentos de ADN es que se pueden obtener grandes cantidades de la secuencia en cuestión para su visualización y posterior análisis. Esta es una prueba altamente sensible y específica para la detección de ADN de cualquier organismo, en el caso de *Neospora caninum* puede ser aplicada a diversos tejidos o fluidos como sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), semen y leche, entre otros; es decir, puede aplicarse ante y pos mortem. El gen repetitivo específico Nc-5 y el espaciador de transcripción interno (ITS1) son los marcadores más comúnmente utilizados para la detección de rutina de *Neospora caninum* basada en PCR, desde la publicación de los primeros protocolos, estos han sido modificados en muchos laboratorios usando una amplia variedad de iniciadores, haciendo PCR anidado para aumentar la sensibilidad de la prueba para detectar al parásito en infecciones de bajo nivel (Donahoe *et al.*, 2015), en este tipo de infecciones la capacidad de detectar al parásito por esta prueba radica principalmente en la estrategia de muestreo, debido a que *Neospora caninum* enquistada principalmente en el cerebro (Dubey *et al.*, 2007; Dubey and Schares, 2011), razón por la cual este órgano es el más frecuentemente utilizado; sin embargo, se reportan hallazgos de ADN del parásito en otros tejidos, en algunos de ellos más comúnmente que en el cerebro como en músculo esquelético, corazón, riñón, hígado, médula espinal y pulmón; al respecto, se ha señalado que el utilizar diferentes tejidos y al menos dos muestras de cada uno, aumenta la probabilidad de detectar al parásito (Donahoe *et al.*, 2015); obviamente, el principal inconveniente de esto es el uso de tejidos que sólo se pueden obtener *posmortem*; en este sentido, la búsqueda de alternativas para el diagnóstico *antemortem*, ha sido variar las opciones a elegir a través del uso de fluidos como leche, calostro, semen y sangre, obteniendo buenos resultados en investigaciones realizadas en diferentes partes del mundo (Okeoma *et al.*, 2004; Caetano-da-Silva *et al.*, 2004; Ferre *et al.*, 2005; Okeoma *et al.*, 2005; Moskwa *et al.*, 2007; Serrano-Martínez *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2009; Marques *et al.*, 2011) y en México (Santana *et al.*, 2010; Mondragón-Zavala *et al.*, 2011; Montiel-Peña *et al.*, 2011).

2.10.6 Aislamiento del parásito. La identificación definitiva de un hospedero intermediario requiere el aislamiento de parásitos de *Neospora caninum* viables por bioensayo en animales o cultivo celular; desafortunadamente, este parásito es notoriamente difícil de aislar en animales infectados naturalmente debido a la escasa viabilidad y al pequeño número de parásitos y puede tomar más de un mes para visualizarlos en cultivos primarios (Conrad *et al.*, 1993). Los bioensayos son costosos, envuelven consideraciones éticas y requieren de animales susceptibles o inmunodeprimidos, razón por la cual, el aislamiento se hace principalmente con fines de investigación para la caracterización de alguna cepa. Para realizar el aislamiento del parásito, el cerebro es el tejido más comúnmente utilizado para este fin; sin embargo, ha sido posible aislar al agente de médula espinal, corazón, lesiones cutáneas, sangre, y algunos otros tejidos (Dubey *et al.*, 2007; Donahoe *et al.*, 2015)

2.11 Producción de leche

Existen reportes en los que los efectos de la infección por *Neospora caninum* han sido asociados con la producción de leche, en algunas publicaciones la infección ha demostrado estar asociada con un decremento en la producción de leche; sin embargo, en otros reportes, la producción de leche se incrementó en vacas seropositivas (Reichel *et al.*, 2013). Con respecto al incremento de la producción se ha reportado que vacas seropositivas produjeron entre 0.4 y 0.6 kg/vaca/día más leche que las vacas seronegativas (Hall *et al.*, 2005). Por otra parte, en un estudio realizado en el 2009 fueron detectados niveles de prolactina plasmática superiores en vacas seropositivas a *Neospora caninum* que en vacas seronegativas de alta producción (García-Ispierto *et al.*, 2009); mientras que en otra investigación se constató que la glándula mamaria lucía más saludable y era aparentemente menos susceptible a los agentes infecciosos en animales infectados con *Neospora caninum* que en los que no lo estaban (Peregrine *et al.*, 2004), pudiendo atribuir esta protección a la acción pro-inflamatoria que desencadena la prolactina (Brand *et al.*, 2004); además se propone que la respuesta inmunológica inespecífica frente a las infecciones podría aumentar (Peregrine *et al.*, 2004). Por tanto, a pesar de que a

nivel hato se reduce la producción de leche por el efecto negativo de la neosporosis en el ciclo reproductivo de la vaca, las vacas infectadas podrían producir más leche que las no infectadas (Almería y López-Gatius, 2009).

Con respecto a la disminución de la producción láctea en vacas seropositivas a *Neospora caninum*, esta va de 0.52 a 1.26 kg/vaca/día (Thurmond y Hietala, 1997; Tiwari *et al.*, 2007); notoriamente más que en el caso contrario, dicha disminución ha sido atribuida a diferentes factores, principalmente al tamaño de hato en el cual se lleva a cabo el estudio (principalmente en hatos grandes del sistema intensivo de producción), al número de lactancia, al manejo sanitario y reproductivo, a la dieta, la presencia de abortos asociados a neosporosis bovina así como la cepa del parásito.

2.12 Antecedentes de la neosporosis bovina

En años recientes, en el mundo se han reportado infecciones por *Neospora caninum* considerándola como una enfermedad emergente cosmopolita que provoca incalculables pérdidas económicas además de los problemas de salud graves en caninos y reproductivos en bovinos (Dubey *et al.* 2007; Wilson *et al.* 2016).

A nivel internacional hay un gran número de estudios en los cuales se menciona la seroprevalencia a la neosporosis bovina, entre ellos: Argentina 22.2% (con un rango de 16.6-64.5), Australia 10.9% (3.8-23.7), Brasil 16.1% (14.1-34.8), Canadá 12.0% (5.5-22.5), Países Bajos 10.4% (9.9-10.8), Nueva Zelanda 30.4% (6.8-73.0), España 19.1% (15.7-35.9), Reino Unido 15.0% (6.0-37.7), Estados Unidos de América 49.2% (16.1-89.2), México 55.9% (42.0-59.0), entre otros (Reichel *et al.* 2013).

El estudio de la neosporosis bovina en México comenzó en 1997 en un feto abortado en el cual se identificaron lesiones compatibles con *Neospora caninum* (Morales *et al.* 1997) siendo el primer reporte sobre la enfermedad. Para 2001, fue publicado un estudio en el cual se incluyeron algunos Estados del país en el que se reportaron las siguientes prevalencias: Hidalgo 72%, Coahuila 47%, Estado de México 59%, Puebla 39%, Chihuahua 63%, Aguascalientes 40%, Querétaro 71%, Zacatecas,

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Jalisco, Durango y Guanajuato con un porcentaje total de 69%. En dicho estudio fueron analizadas un total de 1,003 muestras de suero provenientes de 50 hatos lecheros empleando la prueba de ELISA, se reportó un porcentaje positivo general de 56%, además se analizaron 32 fetos de los cuales 22 tuvieron lesiones típicas de neosporosis y 21 de estos fetos fueron asociados con madres seropositivas, en 17 de ellos fueron detectados parásitos por inmunohistoquímica (IHQ) (Morales *et al.* 2001a). El mismo año se realizó otro estudio con 211 fetos analizados mediante histopatología e inmunohistoquímica, resultando 53 fetos positivos a lesiones microscópicas compatibles con neosporosis y en 41 de estos se identificaron antígenos del parásito (Morales *et al.* 2001b).

En estudios posteriores los resultados obtenidos son muy variados, en 2002 en el Estado de Guanajuato se reportó una prevalencia en ganado productor de leche de 23.3%, en ganado productor de carne de 14.5%, mientras que en ganado de doble propósito fue de 11.6 %; en general, en dicho Estado se obtuvo una seroprevalencia de 20.5% (Córdova, 2002); por otro lado, en Baja California se encontró una prevalencia de 12.4% (Guerrero, 2002). En el mismo año se dio a conocer en hatos lecheros de Aguascalientes una prevalencia general de 59 %, es decir, 110/187 vacas adultas pertenecientes a 13 diferentes hatos resultaron seropositivas empleando la prueba ELISA; del total de ellas (187), 123 tuvieron antecedentes de aborto y de estas 76 fueron positivas a anticuerpos contra *Neospora caninum*, 47 fueron seronegativas; de las restantes 64 vacas sin antecedentes de aborto, 34 de estas resultaron seropositivas. Además, se encontró asociación entre la seropositividad y el aborto, así como presencia del parásito en los 13 hatos incluidos en el estudio (García-Vázquez *et al.* 2002).

Un año más tarde, es reportada una alta seroprevalencia en vacas lecheras de la región de Tizayuca, Hidalgo. En este estudio fueron analizados por medio de ELISA 390 muestras de suero de 13 diferentes hatos, 9 de ellos con presencia de perros; fue descrita mayor prevalencia en los hatos con presencia de caninos, además se identificó como factor de riesgo para la infección la presencia de perros en el hato (Sánchez *et al.*, 2003).

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Posteriormente, en una investigación realizada en establos lecheros de Aguascalientes utilizando fetos abortados y empleando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se reportó un 79.5% de muestras positivas de un total de 44 fetos de los cuales sólo se analizó el cerebro en cinco repeticiones usando los iniciadores NF1, NS2, NR1, SR1. (Medina *et al.*, 2004); por otra parte, en un estudio simultáneo y similar realizado en la cuenca lechera de Tizayuca en el Estado de Hidalgo se dieron a conocer como resultados un 40% de seropositividad en las vacas empleando la técnica de ELISA y presencia de ADN del parásito en 6% de los fetos abortados analizados con un protocolo de PCR punto final con los iniciadores Np 4 – Np 7 (Álvarez *et al.*, 2004).

Por otra parte, se llevó a cabo una investigación utilizando la prueba ELISA en cinco Estados de la República Mexicana: Coahuila, Chihuahua, Hidalgo, Querétaro y Jalisco, obteniendo una seroprevalencia del 42%; además, el 26% de todos los abortos ocurridos fueron atribuibles a *Neospora caninum*, la prevalencia por hato fue de 12% al 100% (García-Vázquez *et al.* 2005). Asimismo, en el norte de México, específicamente en los Estados de Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas se obtuvieron frecuencias de anticuerpos contra *Neospora caninum* de 45, 40 y 16 % respectivamente, con el 90% de ganado lechero y el restante de bovinos productores de carne, de igual modo, eligiendo la técnica de Inmunoabsorción ligada a enzimas (Salinas-Meléndez *et al.* 2005).

Continuando en la misma línea de investigación y empleando la técnica de PCR en su formato anidado, en un trabajo de investigación realizado en fetos abortados provenientes de hatos lecheros del Estado de Aguascalientes, de un total de 44 fetos bovinos abortados se obtuvieron un 80% de estos positivos a *Neospora caninum*, mientras que se identificaron positivos al 40 % del total de fetos positivos por histopatología; demostrando además una baja concordancia entre los resultados obtenidos por PCR y los encontrados mediante inmunohistoquímica atribuida a la sensibilidad y especificidad de ambas pruebas diagnósticas (Medina *et al.*, 2006).

Considerando que en nuestro país, como sucede en otros países del mundo; se realizó una investigación en el Estado de Querétaro en la búsqueda de las principales causas de abortos infecciosos en un hato lechero; al finalizar el trabajo se reportó un 64% de vacas seropositivas mediante ELISA a *Neospora caninum*; asimismo 16 fetos abortados y recuperados fueron analizados, diez de ellos presentaron lesiones tisulares compatibles con brucelosis y leptospirosis y cuatro de ellos consistentes con neosporosis bovina (Escamilla *et al.*, 2007).

En años posteriores, comienza a tener mayor relevancia la neosporosis bovina así como el interés de realizar investigación sobre la misma, por los que se realizaron otros estudios en el Estado de Aguascalientes, reportando una seroprevalencia general de 57.5% de 381 vacas pertenecientes a 29 hatos en establos del Estado, oscilando entre el 22 y 67 % entre los diferentes municipios usando la prueba ELISA, detectando seropositividad contra el parásito en el 99.6% de los hatos analizados, reportando mayor seroprevalencia en la vacas que sufrieron aborto que en las que no lo presentaron, de igual modo se determinó que en los hatos con presencia de perros las seroprevalencias fueron superiores a las de los hatos donde no se encontraron perros (Gutiérrez *et al.*, 2007).

Un año más tarde en un estudio realizado en el trópico mexicano en el que se incluyeron 199 animales de doble propósito, se determinó mediante la prueba de ELISA que el 33.67% de ellos fue positivo a *Neospora caninum* encontrando así mismo que los animales de dos años fueron los de mayor seroprevalencia con el 50 %, en tanto que se determinó que las hembras gestantes obtuvieron mayor seroprevalencia que las vacas vacías (Martínez, 2008).

El siguiente año se publicaron los resultados de un estudio en el que evaluó la seroprevalencia de bovinos productores de carne en el trópico mexicano, concretamente en los estados de Veracruz, Chiapas y Yucatán, obteniendo una seroprevalencia de 8.6 %, 15 % y 11.3 %, respectivamente y general del 11.6% en el sureste del país de un total de 596 animales muestreados mayores a un año (García-Vázquez *et al.*, 2009).

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Con el paso del tiempo los estudios encaminados a conocer la situación epidemiológica de la enfermedad fueron escalados ya que para entonces las investigaciones estuvieron encaminadas a demostrar la presencia del parásito en el ganado bovino. De acuerdo con esto, en el año 2010 empleando la técnica de PCR anidado recurriendo a los iniciadores NF1, NS2, NR1, SR1 con muestras sanguíneas de 20 vaquillas en su primera gestación, se realizó un estudio que tuvo por objetivo detectar el ADN de *N. caninum* en los dos primeros tercios de gestación y al parto. Los hallazgos que se generaron en este estudio fueron: en el primer tercio de gestación 35% de las muestras resultaron positivas, mientras que para el segundo y tercer muestreo resultaron 75% y 50% respectivamente; además, al utilizar la prueba de ELISA las densidades ópticas (DO) determinadas en el segundo tercio de la preñez presentaron valores más elevados en la mayoría de los animales (Santana *et al.*, 2010).

En otro estudio realizado en el mismo año en el Estado de Veracruz, empleando la prueba ELISA se determinó que de 863 hembras pertenecientes a 78 hatos, el 26% de éstas tuvo anticuerpos contra *Neospora caninum* incluyendo ganado lechero, de carne y sus cruzas con el mayor porcentaje en hembras de cinco años de edad y el menor en las de un año; de igual modo, las hembras con más de cinco partos resultaron con una seroprevalencia mayor que las de menos número de partos; con respecto a las 25 hembras con historial de abortos estudiadas en la investigación diez resultaron seropositivas (Romero-Salas *et al.*, 2010).

En estudios encaminados a la identificación de factores de riesgo para la presentación de la neosporosis en el bovino en el estado de Aguascalientes de un total de 110 vacas estudiadas, resultaron seropositivas 61 mediante la prueba de ELISA en dicho estudio el objetivo también fue definir los factores de riesgo asociados con aborto; en esa ocasión solo fue reportada asociación del aborto con la seropositividad a rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB) (Meléndez-Soto *et al.*, 2010).

Posteriormente, otro estudio efectuado en 2011 en el Estado de Aguascalientes, en el que se siguió con la búsqueda de factores de riesgo asociados a la presencia de

anticuerpos específicos contra *Neospora caninum*, se reportó una seroprevalencia del 30% en ganado lechero aunado a esto, en el agua de bebida analizada proveniente de los diferentes establos se encontró que el 90 % de las muestras contenían ADN de *Neospora caninum* (Sierra *et al.*, 2011). De manera complementaria, los resultados encontrados en otro estudio mostraron una seroprevalencia general de 20.8% en ganado de doble propósito en la parte norte de estado de Veracruz, en el mismo se menciona que el 20% de las vacas con antecedentes de aborto fueron positivas a *Neospora caninum* y de 12 hembras seropositivas cuyas muestras sanguíneas fueron sometidas a PCR, en 4 de ellas se detectó ADN del parásito empleando los cebadores NF1, NS2, NR1, SR1 (Montiel-Peña *et al.*, 2011). Mientras que en el centro-norte del país un estudio en ganado productor de carne bajo pastoreo, en Aguascalientes, notificó una seroprevalencia del 23% con un rango de 9-54 %, la prevalencia del ADN del parásito en sangre fue del 28%; 28 animales fueron positivos a las pruebas de ELISA y PCR anidado y se encontró asociación entre la presencia de perros y la seropositividad (Mondragón-Zavala *et al.*, 2011).

Hasta ese momento en diversos sistemas de producción en México se habían realizado investigaciones, en el sistema intensivo de producción de leche, en sistemas semi intensivos, con ganado productor de carne y de doble propósito en regiones tropicales. Para el 2012, fue estudiada la situación epidemiológica de algunas enfermedades relacionadas con la producción de aborto en el bovino, entre ellas la neosporosis bovina, esto en unidades del Sistema de Producción de Leche en Pequeña Escala (SPLPE), denominado por algunos autores como sistema de traspatio o de producción familiar; la investigación se realizó en el altiplano mexicano en tres municipios de la zona oriente del Estado de México, resultando una seroprevalencia promedio para los mismos de 51.08% para *Neospora caninum*, siendo éste el primer trabajo documentado en el que se reporta para dicho sistema de producción (Ojeda *et al.*, 2012). También en el Estado de México, en el municipio de Cuautitlán Izcalli en un hato productor de leche con vaquillas de remplazo y vacas en producción se encontró una seropositividad de 58.16% (García-Reyna *et al.*, 2012).

El mismo año en el Estado de Hidalgo se reporta una seropositividad a *Neospora caninum* del 54.2 % de un total de 500 vacas lecheras además de asociación de este parásito con *Brucella abortus* (21.2 %), el virus de la diarrea viral bovina (DVB) (33.6 %) y rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB) (30.6 %) (Sánchez-Castilleja *et al.*, 2012).

Con el avance en el conocimiento de la enfermedad, su distribución y la participación de diversas especies como hospedadores, para el año 2013 se realiza un estudio en el que se reportó la presencia de *Neospora caninum* por medio de inmunohistoquímica y PCR anidado en un solo tubo con los cebadores NF1, NS2, NR1, SR1 en varios roedores asociados con granjas lecheras de la región de Aguascalientes (Medina-Esparza *et al.*, 2013).

Otros estudios reportan la similitud entre los resultados encontrados en el SPLPE y el sistema intensivo de producción de leche para la neosporosis con una seroprevalencia del 51.7% en el sur-oriente del Estado de México, así como con otras enfermedades relacionadas con el aborto como la Diarrea Viral Bovina (46.6%), la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (18%) y la Leptospirosis (11.8%) (Ojeda-Carrasco *et al.*, 2016).

2.13 Importancia del sistema de producción de leche en pequeña escala (SPLPE) en México

En México los sistemas de producción lechera han sido clasificados de la siguiente forma: especializado o a gran escala, encontrado en el centro norte del país; de doble propósito, llevado a cabo en las regiones tropicales o costeras y por último, el de traspatio o familiar ubicado en el altiplano central mexicano, también conocido como Sistema de Producción Lechera en Pequeña Escala (SPLPE), el cual se caracteriza por depender principalmente de mano de obra familiar en la cual intervienen desde los integrantes más jóvenes hasta los de edad más avanzada dentro de la familia; y contar con escasa o nula tecnología, esto debido al bajo nivel de educación con el que cuentan los productores lo que se refleja en un complicado acceso a subsidios o ayuda técnica y tecnológica (López *et al.*, 2008), también es caracterizado por contar con pequeñas superficies de tierra las cuales son

sembradas por la misma familia con el objeto de proveer alimento al hato; esta alimentación es basada en rastrojo de maíz y/o avena además de incluir el pastoreo en praderas con pastos nativos, dicho hato puede variar en el número de integrantes, los cuales van de tres hasta 35 animales en producción más la recría; además de depender de la compra de insumos para la elaboración de dietas o de la compra de alimentos comerciales siendo ésta la principal inversión monetaria que tiene dicho sistema de producción. Otra característica del SPLPE es su gran capacidad de adaptación a los cambios lo que lo ha convertido en una buena opción para el desarrollo rural (Espinoza-Ortega *et al.*, 2007) ya que estos tipos de sistemas productivos son una fuente de empleo y generación de ingresos para una vida menos carente de las familias campesinas, así como un detonante económico de la región y la principal vía para la cadena de transformación lechera (López *et al.*, 2008), contribuyendo a reducir la migración hacia las ciudades, este sistema de producción aporta el 28% de la producción nacional (Castelán-Ortega *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2013)

En la región oriente del Estado de México las unidades de producción de leche pertenecientes al SPLPE son abundantes y a pesar de las dificultades que se han presentado en el sector lechero persisten como una buena opción para el desarrollo económico; en contraste, de los sistemas tecnificados que hasta hace varios años eran importantes en esta región y que debido a la rápida expansión de la zona conurbada de la Ciudad de México forzaron a estas a desaparecer o cambiar su ubicación.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Todo tipo de enfermedad en cualquier sistema de producción debe ser atendida de forma integral, pero de manera más radical aquellas que disminuyan la reproducción, ya que además de ocasionar gastos considerables por manejo y control, hacen más complicada la posibilidad de tener reemplazos, aumentar el tamaño de la población y la producción de pie de cría.

Los abortos pueden tener gran cantidad de orígenes como nutricionales, hormonales, manejo, estrés o infecciosos, siendo éstos últimos los de mayor importancia, razón por la cual la neosporosis bovina debe ser estudiada a fondo para poder conocer las repercusiones que tiene en el SPLPE y en su caso proponer medidas encaminadas a la prevención que se reflejen en el mejoramiento de la producción lechera (Muñoz *et al.*, 2001; Meléndez-Soto *et al.*, 2010).

A nivel internacional las pérdidas económicas reportadas con respecto al aborto/infección relacionado a *Neospora caninum* se estiman en 1,298 billones de US\$ al año, pudiendo llegar a 2.38 billones de US\$, dos tercios de estas pérdidas pertenecen al ganado lechero. Las pérdidas anuales por hato lechero se aproximan a los 1,600 US\$ y en las granjas para producción de carne se estiman en sólo 150 US\$, las pérdidas calculadas para las vacas gestantes o vaquillas para la producción lechera por individuo son de 20 US\$ mientras que para el ganado productor de carne son sólo de 5 US\$; sin embargo, estas cantidades pueden llegar a ser de 110 y 40 US\$, respectivamente; sin embargo, en este estudio sólo se contemplaron los diez países en los cuales las publicaciones cumplieron los requerimientos de los autores y también mencionan que el costo global real de *Neospora caninum* claramente excede el presentado en este estudio, además de que muy posiblemente que exceda el costo superior calculado. Por otra parte, realizan un cálculo por país incluido y México se encuentra entre los diez contemplados, calculando una pérdida económica de 68.5 millones de US\$ por año (52.4-403.2 US\$) para la industria lechera, mientras que por hato las pérdidas se calculan en menos de 100 US\$ por aborto/infección relacionada a *Neospora caninum* (Reichel *et al.*, 2013).

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

En un estudio publicado en 2001 se reportan pérdidas de alrededor de 2.8 libras de leche por vaca al día (1.27 Lt.) en las vacas seropositivas con respecto a la producción de vacas seronegativas, es decir, entre 3% y 4% de decremento en la producción de leche. En una lactancia regular de 305 días se dejan de producir 800 libras por vaca (362 Lt.), representando 128 US\$ por cada animal seropositivo (Hernández *et al.*, 2001) significando \$2, 368.00 pesos al tipo de cambio promedio actual (\$18.50).

En nuestro país no se tiene conocimiento de las pérdidas económicas que la neosporosis bovina produce en el ganado perteneciente al SPLPE, por lo que es necesario determinar las pérdidas que se producen por la disminución en la producción láctea relacionadas con esta enfermedad en animales seropositivos. Por otra parte, es pertinente realizar un seguimiento a los individuos seropositivos y seronegativos a dicha enfermedad para poder comprobar y/o relacionar la seropositividad y presencia del parásito con la producción láctea.

4. JUSTIFICACIÓN

Se considera que el desarrollo del sector lechero representa un instrumento sostenible, equitativo y poderoso para lograr el crecimiento económico, la seguridad alimentaria y la reducción de la pobreza (FAO, 2014); sin embargo, éste se ve afectado por condiciones asociadas al cambio climático y variantes en los procesos productivos atribuidos a la globalización, aumento poblacional y sostenibilidad de los recursos, además enfermedades que condicionan a estos sistemas de producción, sumado a esto, dentro de los múltiples factores que influyen en la producción lechera, el hecho de que *Neospora caninum* es considerado actualmente como la principal causa de aborto a nivel mundial y de que el hallazgo de seropositividad a este parásito haya sido asociado con una disminución de la producción láctea y el desecho prematuro de vacas, dicho parásito está provocando pérdidas económicas importantes y afectaciones para los productores, en especial en aquellas regiones en donde existen condiciones de vulnerabilidad vinculada a situaciones de pobreza e inseguridad alimentaria de la población.

Si bien las afectaciones provocadas por este parásito han sido detectadas en diferentes sistemas de producción, es en los de pequeña escala donde los efectos resultan más significativos, al representar éstos el medio de subsistencia familiar pero así mismo, por las implicaciones que ello tiene para potenciar el desarrollo de las poblaciones. En el caso de México, si bien las unidades de producción de leche de tipo familiar aportan el 28% de la producción nacional y son consideradas como una alternativa para el desarrollo económico, al promover el autoempleo y detonar la economía regional; se considera que hoy en día las enfermedades y la presencia de abortos están reduciendo la productividad lechera afectando la economía del productor, razón por la cual, el estudio de la neosporosis bovina en los SPLPE se hace necesaria aun cuando la contribución de este sistema no alcanza los niveles productivos de los sistemas de gran escala, pues miles de familias dependen de los ingresos de este sistema de producción y los resultados obtenidos pueden ayudar no sólo en el altiplano mexicano, sino en todos los lugares donde la ganadería de traspatio se presenta por lo cual es importante estimar las pérdidas económicas relacionadas a la disminución de la producción láctea en animales seropositivos a

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA
PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Neospora caninum, así como instrumentar técnicas para su diagnóstico y así poder implementar medidas de control frente a esta enfermedad.

5. HIPOTESIS

La seropositividad frente a *Neospora caninum* reduce la producción láctea en un 5%, y el empleo de PCR anidado con los iniciadores externos Np 21-4 e internos Np 9-10 del gen conservado Nc 5 aumenta la probabilidad de detectar ADN del parásito en leucocitos mediante PCR en vacas del sistema de producción de leche en pequeña escala.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Detectar *Neospora caninum* mediante PCR en sangre y asociar el serostatus frente al parásito con la producción láctea en bovinos del SPLPE del municipio de Amecameca, Estado de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el estatus serológico de vacas del SPLPE del municipio de Amecameca frente a *Neospora caninum* mediante el uso de la prueba ELISA
- Detectar la presencia del *Neospora caninum* en sangre mediante PCR en vacas durante la gestación y lactancia
- Comparar la producción láctea entre vacas seropositivas y seronegativas a *Neospora caninum*

7. METODOLOGÍA

7.1 Localización

En la investigación se seleccionó un hato representativo del sistema de producción de leche en pequeña escala ubicado en el municipio de Amecameca, Estado de México, el cual previamente se había determinado como seropositivo a *Neospora caninum* y en el que se determinaron la presencia de abortos. El municipio de Amecameca, está localizado en el sur oriente del Estado de México a una altura de 2400 msnm, cuenta con un clima templado subhúmedo Cb (w2) y precipitación pluvial promedio de 935 mm anuales (INAFED, 2000). Fueron muestreadas un total de 34 hembras con diferente número de partos y tiempo de gestación. El muestreo se realizó a lo largo de cinco meses.

El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Microbiología y Parasitología del Centro Universitario Amecameca de la Universidad Autónoma del Estado de México.

La realización de las pruebas diagnósticas de ELISA y PCR se efectuó en el Laboratorio de la Unidad de *Babesia* del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CENID-PAVET del INIFAP) ubicado en Jiutepec, Morelos.

7.2 Características del hato

En este hato n=34 (hembras en producción), se ha aplicado un programa de vacunación desde el año 2012, inmunizando contra Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Parainfluenza tipo 3, Virus Sincitial Respiratorio Bovino y Leptospirosis con 5 serovariedades, relacionados como agentes productores de aborto en el bovino; en este hato no se permite la entrada de caninos, la alimentación es a base de ensilado de maíz, alfalfa, heno de avena y se suplementa con alimento balanceado comercial con 18% de proteína cruda (P.C.), además de realizar pastoreo en praderas inducidas sobretodo en la época de sequía, el total de las vacas fue del fenotipo Holstein, habitualmente se utiliza la inseminación artificial y se observó la presencia de roedores, pájaros y otros animales domésticos dentro del hato.

7.3 Muestreo para la determinación del estatus serológico mediante ELISA

Todas las hembras en producción fueron muestreadas al inicio del experimento por punción de la vena coccígea utilizando tubos al vacío sin anticoagulante obteniendo aproximadamente 8 mililitros de sangre por animal, identificando cada tubo de forma adecuada. El suero fue obtenido mediante centrifugación a 2500 rpm durante 10 minutos y conservado a -20°C hasta su utilización. Dichos sueros se emplearon para la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA empleando una prueba comercial (*Neospora caninum* antibody test kit, IDEXX™-Laboratories Inc., Westbrook, Maine USA; con 100% de sensibilidad y 98.9% de especificidad) usando una dilución de 1:100 de cada uno de los sueros problema, cada suero se analizó por duplicado y la lectura de las microplacas se efectuó en un espectrofotómetro con un filtro de 650 nm; se consideró 0.50 como punto de corte acorde a la información proporcionada por el fabricante.

Para determinar la seroprevalencia general se empleó la fórmula:

$$\text{Seroprevalencia general} = \frac{\text{total de animales seropositivos} * 100}{\text{total de animales muestreados}}$$

Para la determinación de la seroprevalencia por hato se empleó la fórmula:

$$\text{Seroprevalencia por hato} = \frac{\text{animales seropositivos} * 100}{\text{animales muestrados}}$$

7.4 Muestreo para la realización de la PCR

Posterior a la obtención de resultados de la prueba ELISA, los animales fueron muestreados mensualmente por punción de la vena coccígea para la obtención de sangre periférica utilizando tubos al vacío con anticoagulante EDTA, se procedió a la centrifugación de dichas muestras a 3500 rpm durante 10 min para la separación del plasma, el paquete de glóbulos rojos y hacer la obtención de glóbulos blancos, los tubos se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento para la detección de ADN de *Neospora caninum*. La extracción de ADN se realizó con un paquete comercial (UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation kit, MO BIO Laboratories, Inc.). Para la

técnica de PCR anidado se utilizaron los pares de iniciadores externos del gen Nc-5, **Np 21** 5´ GGG TGT GCG TCC AAT CCT GTA AC 3´ **Np 4** 5´ CCT CCC AAT GCG AAC GAA A 3´ que amplifican un fragmento de 380 pares de bases (pb) (Yamage *et al.*, 1996) con el siguiente protocolo de amplificación, para la pre desnaturalización 5 minutos (min) a 95°C seguido por 35 ciclos, para desnaturalización a 94°C durante 60 segundos (seg), para alineamiento 57°C por 60 seg, extensión 72°C durante 60 seg y para finalizar 7 min a 72°C como extensión final.

Los iniciadores internos empleados fueron **Np 9** 5´ GTT GCT CTG CTG ACG TGT CGT TG 3´ y **Np 10** 5´ CTC AAC ACA GAA CAC TGA ACT CTC G 3´ que amplifican un fragmento de 222 pb. (Mc Innes *et al.*, 2006), con protocolo de 5 min a 94°C para pre desnaturalización, 35 ciclos con temperatura de 94°C por 30 seg. para desnaturalización, 20 seg. a 63°C para alineamiento, extensión durante 30 seg. a 72°C, finalmente, 10 min a 72°C en el caso de la extensión final (Yao *et al.*, 2009). En el periodo de estudio se reportaron 2 abortos por el propietario dentro del hato, el primero con 7 meses de edad en una vaca de segunda gestación y el segundo de 3 meses de edad de una vaca con un parto, de estos solo el último se pudo recuperar adecuadamente, este se mantuvo en refrigeración para el traslado al laboratorio y posterior congelación a -20 °C hasta su utilización; se procesaron dos muestras de 50 mg de diferentes zonas del cerebro que fueron sometidas a la PCR con los iniciadores y protocolos anteriormente descritos.

7.5 Medición de la producción de leche

Para el análisis de la producción se registró la cantidad de leche producida por cada vaca realizando la medición de la misma dos veces al día (ordeño de la mañana y de la tarde) cada semana y a lo largo de 36 meses; se hizo el ajuste de la producción por lactancia a 305 días (equivalente maduro); la información se analizó separando en grupos de acuerdo a la seronegatividad o seropositividad a *Neospora caninum*, el análisis estadístico de la producción de leche se realizó mediante ANOVA con un programa de cómputo (Statgraphics, Centurion).

7.6 Estimación del valor comercial de la leche.

Se estimó el valor de la producción por lactancia para cada uno de los grupos antes mencionados, considerando el precio comercial de la leche en la región (\$6.00 litro)

8. RESULTADOS

Los resultados de la investigación son presentados en un capítulo de libro y un artículo científico que han sido enviados para su publicación.

La primera parte es referente a la asociación de la producción láctea con la seropositividad al parásito y la segunda a la detección de *Neospora caninum* en leucocitos de vacas empleando PCR anidado.

XVI Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria

26, 27 y 28 de octubre de 2016, Universidad Autónoma Chapingo

ASUNTO: DICTÁMEN

16 de agosto de 2016

ESTIMADO JUAN JOSÉ OJEDA CARRASCO
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
P R E S E N T E

Por este medio tenemos el agrado de informarle que el resumen

“Asociación de la seropositividad a *Neospora caninum* a la disminución de producción de leche en el sistema de producción familiar mexicano”

de los siguientes autores:

Raúl Miguel Reyes Sandoval, Juan José Ojeda Carrasco, Pedro Abel Hernández García,
Enrique Espinosa Ayala, Carmen Rojas Martínez, Jesús Antonio Álvarez Martínez

fue aceptado para su presentación en el XVI Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria.

Le informamos que para que su trabajo pueda ser publicado en Libro Electrónico o Impreso con ISBN, deberá de cumplir con los Criterios de Calidad (de acuerdo con la evaluación del Comité Científico) y las Normas Editoriales establecidas por los organizadores del congreso. Se anexa archivo con la información correspondiente.

Agradeciendo su participación, le saludan.

ATENTAMENTE

Dr. Benigno Ramírez Valverde

Dr. Alfredo Cesín Vargas

Coordinadores del Comité Científico del Congreso



Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia
Tels. 01 (595) 95 21 500 Extensión 5078 | Email: cisocpec@gmail.com y cisocpec@yahoo.com.mx
Página web: www.consocpec.com.mx

Re: Trabajo en extenso

Congreso Socioeconomía pecuaria

lun 12/09/2016 04:27 p.m.

Para: Juan José Ojeda Carrasco <mvzrojeda@hotmail.com>;

Juan José Ojeda Carrasco

P r e s e n t e

Se le informa que se ha recibido satisfactoriamente el trabajo en extenso "*Asociación de la seropositividad a Neospora caninum a la disminución de producción de leche en el sistema de producción familiar mexicano*".

Saludos cordiales.

Atentamente

Comité Organizador

XVI Congreso Nacional de Investigación Socioeconómica y Ambiental de la Producción Pecuaria.

Universidad Autónoma Chapingo.

26, 27 y 28 de Octubre, 2016.

Informes: 01 (595) 95 21 500. Extensión 5078

Pag. web: <http://www.consocpec.com.mx>

El Lunes, 12 de septiembre, 2016 15:31:17, Juan José Ojeda Carrasco <mvzrojeda@hotmail.com> escribió:

Estimados miembros del Comité Organizador:

Anticipándoles un saludo, adjunto la ponencia en extenso del trabajo:

Asociación de la seropositividad a *Neospora caninum* a la disminución de producción de leche en el sistema de producción familiar mexicano

Se había solicitado información sobre una duda referente a la bibliografía y se nos respondió hasta el día de hoy, pero ya se había enviado en trabajo.

En esta versión los nombres de las revistas están completos, es solo el ajuste realizado.

De antemano agradezco la atención.

Dr. Juan José Ojeda Carrasco

Asociación de la seropositividad a *Neospora caninum* a la disminución de producción de leche en el sistema de producción familiar mexicano

Raúl Miguel Reyes Sandoval¹, Juan José Ojeda Carrasco², Pedro Abel Hernández García³, Enrique Espinosa Ayala⁴, Carmen Rojas Martínez⁵, Jesús Antonio Álvarez Martínez⁶.

Introducción

Neospora caninum es un parásito protozoario intracelular obligado, perteneciente al Phylum Apicomplexa reconocido por primera vez en perros de Noruega que mostraron signología neurológica (Bjerkås, Mohn, Presthus, 1984: 271); posteriormente, en 1988 el parásito fue aislado y se describieron el género y la especie (Dubey, et al., 1988: 1283). Este parásito pertenece a la Familia *Sarcosistidae* que agrupa taxonómicamente a otros protozoarios formadores de quistes como *Hammondia heydorni* y *Toxoplasma gondii*, con éste último guarda una relación muy estrecha ya que a pesar de ser inmunológica y estructuralmente diferente, en el pasado fue confundido debido a su similitud morfológica y presentación clínica (Dubey, 2003: 2; Wilson et al., 2016: 46). *Neospora caninum* es el agente causal de la neosporosis bovina, enfermedad que puede causar abortos entre el tercer y noveno mes de gestación aunque es más frecuente que ocurran entre el cuarto y sexto, además de causar reabsorción embrionaria, muerte fetal temprana, mortinatos y muerte neonatal, provocando un efecto negativo importante en diferentes parámetros reproductivos y en la producción de leche; aunque afecta principalmente al ganado lechero, el ganado productor de carne también sufre afectación lo que ha sido reportado en gran parte del mundo (Dubey, Schares, 2006: 93; Donahoe et al., 2015: 217).

¹ Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Nacional Autónoma de México, e-mail popoxtla1@hotmail.com

² Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Nacional Autónoma de México, e-mail mvzojeda@hotmail.com

³ Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Nacional Autónoma de México, e-mail pedro_abel@yahoo.com

⁴ Centro Universitario UAEM Amecameca, Universidad Nacional Autónoma de México, e-mail enresaya1@hotmail.com

⁵ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), e-mail rojas.carmen@inifap.gob.mx

⁶ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), e-mail alvarez.jesus@inifap.gob.mx

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Diversos estudios realizados en vacas del sistema de producción intensivo, han mostrado que la seropositividad al parásito está asociada con la disminución de la producción de leche, dicha disminución puede oscilar desde 0.52 a 1.27 kg/leche/vaca/día (Thurmond, Hietala, 1997: 673; Hernández et al., 2001: 633). Al respecto, se ha señalado que en una lactancia regular de 305 días se dejan de producir alrededor de 800 libras de leche por vaca (362.8 kg), representando en su momento una pérdida de 128 US\$ por cada animal seropositivo (Hernández, Risco, Donovan, 2001: 634); otros autores proponen que por hato las pérdidas se calculan en alrededor de 100 US\$ por aborto/infección relacionada a *Neospora caninum*, lo cual también ha sido observado en el sistema intensivo de producción de leche (Reichel et al., 2013: 138). Aunado a las pérdidas que se generan en la producción lechera por los efectos de este parásito, se ha reportado un aumento en la probabilidad de que las vacas seropositivas puedan sufrir aborto entre 3 y 27 veces (Nogareda et al., 2007: 198).

Aun cuando se considera que el desarrollo del sector lechero representa un instrumento sostenible, equitativo y poderoso para lograr el crecimiento económico, la seguridad alimentaria y la reducción de la pobreza (FAO, 2014: 1), es un hecho que las nuevas condiciones asociadas al cambio climático y variantes en los procesos productivos impulsados por el proceso de globalización, están siendo una condicionante para estos sistemas productivos. Aunado a ello, dentro de los múltiples factores que influyen en la producción lechera, el hecho de que *Neospora caninum* sea considerado actualmente como la principal causa de aborto a nivel mundial y de que el hallazgo de seropositividad a este parásito haya sido asociado con una disminución de entre el 3 al 4% de la producción láctea y al desecho prematuro de vacas, está provocando pérdidas económicas importantes y afectaciones para los productores, en especial en aquellas regiones en donde existen condiciones de vulnerabilidad vinculada a situaciones de pobreza e inseguridad alimentaria de la población.

Si bien las afectaciones provocadas por este parásito han sido detectadas en diferentes sistemas de producción de grande, mediana y pequeña escala, es en

éstos últimos donde los efectos resultan más significativos, al representar el medio de subsistencia familiar pero así mismo, por las implicaciones que ello tiene para potenciar el desarrollo de las poblaciones. En el caso de México, si bien las unidades de producción de leche de tipo familiar aportan el 28% de la producción nacional y son consideradas como una alternativa para el desarrollo económico, al promover el autoempleo y detonar la economía regional; se considera que hoy en día las enfermedades y la presencia de abortos están reduciendo la productividad lechera afectando la economía del productor.

Producción lechera, Seguridad alimentaria y pobreza

En la actual dinámica socio-económica mundial, el sector productivo lechero está adquiriendo cada vez mayor significancia debido a que la demanda de leche y productos lácteos en los países en desarrollo está creciendo como consecuencia del aumento de los ingresos, el crecimiento demográfico, la urbanización y los cambios en los regímenes alimentarios. Sin embargo, una problemática que actualmente se enfrenta es que si bien el consumo de leche *per cápita* se ha duplicado, en los últimos años la producción lechera no ha logrado mantener los niveles de productividad, acordes con la demanda. A pesar de que la producción lechera aporta entre el 9 y 17% de los requerimientos para el suministro de energía alimentaria, proteínas alimentarias y grasas alimentarias para la población mundial, se considera que es indispensable fortalecer a este sector, a fin de incrementar la seguridad alimentaria de diversas poblaciones, como coadyuvante para superar las condiciones de pobreza.

A diferencia de la idea que se sostenía en la *Cumbre Mundial de la Alimentación* de 1983, en la que se consideraba que hablar de Seguridad Alimentaria, implicaba hacer énfasis entre el equilibrio de la demanda y el suministro, con el fin de asegurar que todas las personas tengan en todo momento acceso físico y económico a los alimentos básicos que necesitan, desde 1996 se sostiene que la seguridad alimentaria sólo puede darse cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para

satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana (CMA, 1996: 3).

No obstante, se considera que una de las grandes contradicciones actuales es el hambre generalizada y persistente, pues si bien la agricultura mundial actual produce hoy en día un 17% más de calorías por persona que hace 30 años, de modo que pudiera ser suficiente para alimentar a la población mundial, la existencia de 780 millones de personas que padecen hambre crónica en el mundo indica que hay un problema fundamental respecto de la distribución de alimentos y de los recursos para su acceso, lo que lleva a sostener que el problema de la seguridad alimentaria es un problema de pobreza y viceversa. Es decir, el hambre y malnutrición en un mundo donde abundan los alimentos implican que la pobreza extrema es la causa principal de la desnutrición, pero a su vez son importantes causas de la pobreza ya que afectan de diversas maneras la capacidad de los individuos para escapar a la pobreza (FAO, FIDA, PMA, 2002: 5).

En este marco, se considera que una de las estrategias es impulsar lo que la FAO ha llamado el “enfoque de doble componente”, en donde el primer componente se ocuparía de medidas de recuperación para establecer sistemas alimentarios con capacidad de recuperación, considerando que los factores que afectan la capacidad de los sistemas alimentarios son la estructura de la economía alimentaria en su conjunto, así como sus elementos, como la producción agrícola y pecuaria, la tecnología, la diversificación de la industria alimentaria, los mercados y el consumo; en tanto que desde el segundo componente se evaluarían las opciones para dar apoyo a los grupos desprotegidos, que implica el análisis de la vulnerabilidad que requiere dar atención especial a los riesgos y a las opciones para su gestión. Este doble enfoque consideraría dos vertientes, respecto de los componentes de disponibilidad y acceso:

1) Desarrollo rural, incremento de la productividad:

- Disponibilidad: Incremento del suministro de alimentos para los más vulnerables, *Incremento de la producción rural de alimentos, en especial entre los pequeños productores*, inversión en infraestructura, revitalización

del sector pecuario, restablecimiento y conservación de los recursos, incremento de los ingresos y otros derechos a los alimentos.

- Acceso y utilización: Restablecimiento de las instituciones rurales, incremento del acceso a activos, reactivación de los sistemas de financiación rural, fortalecimiento del mercado de trabajo, *Mecanismos para asegurar la inocuidad de los alimentos*.

2) Acceso directo a los alimentos:

- Disponibilidad: Ayuda alimentaria, dotación de semillas e insumos para las actividades agrícolas y pecuarias, reposición del capital pecuario, facilitación de la reanimación del mercado.
- Acceso y utilización: Transferencia de alimentos y efectivo, redistribución de activos, programas de rehabilitación social y programas de intervención nutricional (Pingali, Alinovi, Sutton, 2005).

En términos generales, se espera que toda estrategia que busque incidir en estos aspectos de la seguridad alimentaria para combatir la pobreza y promover el desarrollo de las regiones, deba contemplar los siguientes aspectos:

1. Atención a la seguridad alimentaria: Garantizar que los objetivos relacionados con la seguridad alimentaria se incorporen en las estrategias nacionales para reducir la pobreza, a través de los cuales se tomen en cuenta las repercusiones en el país, subnacionales, en los hogares y en las personas, haciendo énfasis en particular en la reducción del hambre y la pobreza extrema.
2. Promoción de un crecimiento agrícola y rural sostenible y de amplia base: Fomentar el desarrollo ambiental y socialmente sostenible como piedra angular del crecimiento económico.
3. Atender la totalidad del ámbito rural: Tener en cuenta, los diversos aspectos de la producción agrícola y pecuaria, así como las oportunidades de obtener ingresos fuera del espacio local.

4. Atención a las causas fundamentales de la inseguridad alimentaria: Promover no sólo el aumento de la productividad, sino también el acceso a los recursos, la tenencia de la tierra, la remuneración de la mano de obra y la instrucción.
5. Atención a las dimensiones urbanas de la inseguridad alimentaria: Tratar los factores singulares que determinan el aumento de la pobreza urbana e incrementar la seguridad alimentaria en cuanto a disponibilidad y acceso, promoción del mercado, gestión de los recursos naturales y acceso a los servicios básicos.
6. Atención a cuestiones transversales: Tener en cuenta las políticas y cuestiones nacionales e internacionales que repercuten en la ejecución y los resultados, incluidas la reforma del sector público y la descentralización, la paz y la seguridad, el comercio y las reformas de las políticas macroeconómicas.
7. Fomento de la participación de todas las partes interesadas en el diálogo que conduce a la elaboración de estrategias nacionales (Stamoulis, Zezza, 2003: 28).

Según se observa, dentro del Desarrollo Rural e incremento de la productividad, unos de los factores señalados como relevantes para la disponibilidad y el acceso-utilización, son el incremento de la producción rural de alimentos, en especial entre los pequeños productores y los mecanismos para asegurar la inocuidad de los alimentos, respectivamente. En este marco, existe un consenso generalizado en afirmar que dentro de los sistemas productivos locales que pueden dar un mayor impulso al desarrollo de las regiones, los sistemas de producción lechera juegan un papel preponderante. Dentro de la cadena de valor de los sistemas productivos lecheros, los pequeños productores realizan aportaciones importantes ya que más del 80% de la leche producida en los países en desarrollo procede de los productores a pequeña escala, lo que significa que la actividad lechera tiende a mejorar la seguridad alimentaria y a representar una fuente de empleo e ingresos para millones de familias de pequeños productores en todo el mundo (FAO, 2014:

2). No obstante, también se reconocen los grandes estragos que se han producido en este sector como resultado de la crisis económica, los altibajos en los precios de la leche internacional que interfieren de forma directa en los precios de la leche nacional, así como diversos factores que están afectando el comercio internacional de lácteos como son la división entre países con problemas de fiebre aftosa y aquellos que no la tienen, la creciente variedad de productos que se comercializan, la participación de grandes corporaciones y las distorsiones que existen en los mercados, a raíz de las medidas de apoyo, subsidios a la producción y a la exportación en los países desarrollados. La situación en las diferentes regiones del mundo marca diferencias significativas, pues en tanto en la Unión Europea, Nueva Zelanda y Estados Unidos hay una sobre-producción, en los países en vías de desarrollo se encuentran fuertes contrastes, en donde mientras países como México, Brasil y Venezuela contabilizan más del 90% del déficit comercial de lácteos, Argentina y Uruguay tienen el mayor superávit (Secretaría de Economía, 2012: 4). Del mismo modo, la producción láctea actual enfrenta problemas cuyo origen no está en los aspectos económico, político o financieros, sino que se encuentran asociados a diversos factores provocados por el cambio climático, que está provocando la muerte de animales, enfermedades, desabasto de alimentos para pienso, forrajes, entre otros, así como las dificultades financieras por las que atraviesan distintos países (INFOASERCA, 2010: 34).

Sistemas de producción lechera en México

En México se distinguen diferentes sistemas de producción de leche: a) *Sistemas de producción especializado*, cuentan con ganado especializado en la producción de leche, principalmente de las razas Holstein, Pardo Suizo y Jersey, son sistemas que tienen tecnología altamente especializada, en los que predomina el manejo de los animales en corrales (estabulado). Los animales se alimentan de forrajes y alimentos balanceados y el proceso de ordeña se realiza a través de maquinaria especializada, la leche se destina a las principales plantas procesadoras y transformadoras del país. Este tipo de sistemas se desarrolla principalmente en el altiplano y las zonas áridas y semiáridas del norte de México, b) *Sistemas de*

producción semi-especializado, cuentan con animales de las razas Holstein y Pardo Suizo principalmente, los animales se mantienen en semiestabulación (corral-pastoreo), por lo que la alimentación se da a través del pastoreo que se complementa con forrajes y alimento concentrado, el ordeño se realiza de forma manual o con máquinas sencillas, c) *Sistema de producción de doble propósito*, se desarrolla principalmente en las regiones tropicales de México, aunque también se pueden encontrar en regiones de clima árido, semiárido y templado, empleando las razas Cebuinas y sus cruzas con Pardo Suizo, Holstein y Simmental. Se le llama de doble propósito porque con el ganado de estas explotaciones se produce carne o leche, dependiendo de lo que exija el mercado. Su alimentación se basa en el pastoreo y la ordeña se realiza generalmente de forma manual. La leche que aquí se produce es vendida directamente al consumidor y d) *Sistema de producción familiar o de traspatio*, en este sistema el ganado se explota en pequeñas superficies de terreno, principalmente en las viviendas (por eso se le llama de traspatio), pueden tener a los animales en corrales o en pastoreo dependiendo de las condiciones de sus campos de cultivo. Tienen animales Holstein y Pardo Suizo (en menor cantidad), así como cruzas. Las instalaciones son rudimentarias y predomina el ordeño manual. En este sistema las vacas pastorean y también comen forrajes. La leche que producen se destina para el autoconsumo o es vendida en la misma comunidad (SAGARPA, 2013).

De acuerdo con datos del INEGI, generados a partir del último Censo Agrícola, Ganadero y Forestal, el mayor porcentaje de la producción de leche nacional proviene de ganado especializado y de ganado de doble propósito. En la producción lechera de ganado especializado, los estados y regiones con mayor producción son Jalisco (con un 18.8%), Región Lagunera (19.2%), Chihuahua (9.3%) y Veracruz (6.9%); en tanto que la producción asociada a ganado de doble propósito el principal estado productor es Veracruz (15%), seguido de Jalisco (10%), Sinaloa (8%), Sonora (6%) y Chiapas (5.5%) (INEGI, 2007).

Aun cuando la contribución de los Sistemas de Producción de Traspatio no alcanza los niveles que los anteriores, de mayor cobertura y tecnificación, su aportación es

relevante en muchos sentidos, una al promover fuentes de autosustento y empleo familiar y con ello a ser un soporte económico para la población, así como por contribuir con el 28% de la producción nacional (Castelán-Ortega et al., 2008: 134; Hernández et al., 2013: 20) y se caracteriza por depender principalmente de la participación de mano de obra familiar para la realización de las actividades, contar con escasa o nula tecnología lo que se atribuye al bajo nivel de educación con el que cuentan los productores y que además se refleja en un difícil acceso a subsidios o apoyos de programas gubernamentales así como de asesoría técnica y apoyos tecnológicos (López et al., 2008: 1); asimismo, cuentan con pequeñas superficies de tierra que son sembradas con el objetivo primordial de la producción para autoconsumo y de subsistencia, principalmente de granos como el maíz y trigo, frijol y haba; los esquimos agrícolas proveen alimento al hato cuya alimentación se basa en rastrojo de maíz y/o avena además de incluir el pastoreo en praderas con pastos nativos. Un problema para este sistema es que los ingresos generados por la producción de leche son destinados en gran medida a la compra de insumos para la elaboración de dietas o la compra de alimentos comerciales. Respecto a la estructura del hato, ésta puede variar en el número de semovientes, los cuales van de tres hasta 35 animales en producción más la recría. Desde el punto de vista socioeconómico, la principal característica de este sistema es su gran capacidad de adaptación a los cambios lo que lo ha convertido en una buena opción para el desarrollo rural (Espinoza-Ortega et al., 2007: 40), ya que este sistema es una fuente de autoempleo y generación de ingresos para una vida menos carente de las familias que lo integran, así como un detonante económico de la región y la principal vía para la cadena de transformación lechera, además de contribuir al arraigo y la disminución de la migración hacia las grandes ciudades (López et al., 2008: 1). En nuestro país no se tiene conocimiento de las pérdidas económicas que produce la neosporosis bovina en el sistema de producción familiar, por lo que el objetivo del presente estudio fue comparar la producción de leche ajustada a 305 días y su asociación a la situación serológica frente a *Neospora caninum*, así como estimar las pérdidas económicas ocasionadas por la disminución de la producción láctea por esta causa en el sistema de producción familiar.

Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en un hato ubicado en el municipio de Amecameca, Estado de México, localizado en el sur oriente del Estado de México a una altura de 2400 msnm, cuenta con un clima templado subhúmedo Cb (w2) y precipitación pluvial promedio de 935 mm anuales (INAFED, 2000: 1).

Características y manejo del hato bovino

Este hato es característico del sistema familiar de producción láctea con historial de abortos, todas las vacas fueron de fenotipo Holstein con diferente número de lactancia, el ordeño se realiza de forma mecánica dos veces al día. La dieta estuvo basada en ensilado de maíz, forraje de alfalfa, heno de avena y se suplementa con alimento balanceado comercial con 18 % de proteína cruda (P.C.); también se emplea el pastoreo en praderas artificiales de alfalfa principalmente en la época de estiaje, la presencia de otras especies como gansos, palomas, cerdos, équidos y ratas fue observada dentro del hato; no se permite la entrada de caninos. El manejo reproductivo se realizó sin modificar el protocolo habitual de la unidad de producción mediante el uso de inseminación artificial y dentro del manejo preventivo se aplica un programa de vacunación desde 2012, inmunizando contra Brucelosis, Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Parainfluenza tipo 3, Virus Sincitial Respiratorio Bovino y Leptospirosis con 5 serovariedades, agentes etiológicos relacionados con la producción de aborto en el bovino.

Muestreo y diagnóstico

Para determinar el estatus serológico frente a *Neospora caninum*, todas las hembras en producción fueron muestreadas al inicio del experimento por punción de la vena coccígea utilizando tubos al vacío sin anticoagulante. El suero fue obtenido mediante centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos y conservado a -20 °C hasta su utilización. Los sueros se emplearon para la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* mediante un ensayo inmunoenzimático ELISA empleando un paquete comercial (*Neospora caninum* antibody test kit, IDEXX™. Laboratories Inc., Westbrook, Maine USA; presenta 100 % de sensibilidad y 98.9 % de

especificidad) se empleó una dilución de 1:100 de cada uno de los sueros problema y se analizaron por duplicado; la lectura de las microplacas se efectuó en un espectrofotómetro con un filtro de 650 nm; se consideró 0.50 como punto de corte acorde a la información proporcionada por el fabricante.

Medición de la producción láctea y análisis estadístico

La producción de leche en el hato fue monitoreada durante 36 meses, registrando la producción láctea matutina y vespertina de cada vaca una vez por semana, estimándose con estos datos la producción semanal, mensual y por lactancia; se realizó el ajuste de la producción de cada lactancia a equivalente maduro (Mc Dowell, 1975: 2). De acuerdo al estatus serológico se formaron dos grupos de vacas: seropositivas (G1) y seronegativas (G2); la producción promedio de cada grupo fue comparada al igual que el número de lactancia en el cual que se encontraron las vacas incluidas en el estudio. Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) para el escrutinio de los datos con la ayuda del paquete Statgraphics, Centurion^{MR}.

Valor económico: Para estimar el valor económico de las pérdidas en la producción de leche se multiplicó el promedio de producción de cada grupo por el valor comercial por litro de leche de la zona (\$6.00 pesos).

Asociación de la producción de leche y seropositividad a *Neospora caninum*.

El 27 % de las vacas resultó positiva mediante la prueba ELISA (10/37). Fueron registradas 37 lactancias a las cuales se realizó el ajuste al equivalente maduro (305 días) obteniendo un promedio de producción de 3,755.1 Kg. de leche por lactancia para el grupo de vacas seropositivas (10 vacas) y de 4,390.9 Kg para las vacas seronegativas (27 vacas) lo que se traduce en 12.31 y 14.39 kg de leche/vaca/día respectivamente. Con relación al valor económico promedio de leche de cada grupo fue de \$22,530.00 pesos por lactancia para las vacas seropositivas y \$26,345.40 pesos por lactancia para las seronegativas. El análisis no mostró diferencia estadística para el promedio de producción entre ambos grupos ($P = 0.214$); de igual manera, al realizar la comparación entre el número de lactancia no fue posible

demostrar diferencia estadística ($P= 0.057$); en ambos casos, esto pudiese ser entendible debido al número de observaciones con las que se contó; no obstante, es bien conocido que existe diferencia en la producción de acuerdo al número de lactancia siento que una vaca al primer parto produce entre el 75 y 78% del potencial de su producción, y en el tercer parto puede lograr cerca del 95% de su potencial máximo de producción.

A pesar de que la producción entre grupos (G1) y (G2) no mostró diferencia estadística en la producción láctea, se considera que es de importancia pues la reducción de esta es de 14.46% en las vacas seropositivas frente a la producción de las vacas seronegativas; en producción equivale a una reducción de 635.9 Kg de leche (\$3,815.40 pesos). Los reportes que existen respecto a la disminución de la producción láctea en ganado de alta producción en sistemas intensivos mencionan entre 3 y 4 %, representando aproximadamente 362 kg de leche por lactación (Hernández et al., 2001: 634), lo que resulta ser poco más de la mitad de lo encontrado en este estudio; de igual forma, con el promedio de producción de leche por día, se ha mencionado una disminución de 1.13 kg/vaca/día en vacas seropositivas a *Neospora caninum* con diferente número de lactancia (Hernández et al., 2001: 635) y 1.26 kg/vaca/día en vacas seropositivas de primera lactancia (Thurmond, Hietala, 1997: 674), siendo de 2.08 Kg/vaca/día para las vacas seropositivas a la enfermedad en vacas pertenecientes al sistema de producción lechera familiar del altiplano mexicano, casi el doble de lo reportado.

Entre los factores de mayor importancia relacionadas con un nivel bajo de producción en este sistema de producción se puede considerar la constante variación en la calidad de los alimentos a lo largo del año, así como su disponibilidad, ya que no todas las familias dedicadas a producir leche dentro de este sistema cuentan con tierras o infraestructura para su correcto almacenaje; el manejo del ganado y el tipo de ordeño, además de la calidad genética de los animales con los que se cuenta, aunado a esto la energía utilizada en desplazarse durante el pastoreo.

Conclusiones

Con base en el estudio realizado, se concluye que las vacas seropositivas a *Neospora caninum* pertenecientes al sistema de producción lechera familiar del municipio de Amecameca producen menor cantidad de leche que las vacas seronegativas, lo que representa una importante pérdida económica para los productores; sin embargo, es necesario realizar más investigación en un número mayor de hatos pertenecientes a este sistema de producción para poder afirmar de manera contundente que al igual que en los sistemas de producción intensiva la seropositividad a *Neospora caninum* es un factor por el que la producción de leche se ve disminuido. Las estrategias de control y remediación que puedan propiciar la erradicación de este parásito, no sólo tendrá efectos en la sanidad animal, sino contribuirá a la seguridad alimentaria al incrementar los volúmenes de producción de leche y a fortalecer las condiciones de las familias al contar con recursos para acceder a otros alimentos, contribuyendo con ello al desarrollo rural e incremento de la productividad y a fortalecer los mecanismos para garantizar la inocuidad de los alimentos.

Literatura citada

Bjerkås, I.M., Mohn S.F. and Presthus J., 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and miositis in dogs. *Zeitschrift für parasitenkunde*, 70(2):271-274

Castelán-Ortega, Octavio Alonso., Estrada-Flores, Julieta Gertrudis., Espinoza, Ortega Angélica, Sánchez Vera Ernesto., Ambriz, Vilchis Virgilio., Hernández and Ortega. M.,2008. "Strategies for the management of agroecosystem resources in temperatures zones of Mexico: the case of campesino milk farmers in the central highlands" En: Castelán, Ortega Octavio Alfonso., Bernués, Jal Alberto, Ruíz, Santos R., and Mould, F.L. (Eds.). *Opportunities and challenges for smallholder ruminant systems in Latin America, resource management, food safety, quality and market access*. Toluca, Estado de México, Universidad Autónoma del Estado de México, pp: 133-160.

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

CMA, 1996. “Cumbre Mundial de la Alimentación”, En: http://www.fao.org/wfs/index_es.htm

Donahoe, S.L., Lindsay, S.A., Krockenberger, M., Phalen, D. and Slapeta, J., 2015 “A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wild life”. *Int. J. Parasitol. Parasites Wild.* 4:216-238 doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.04.002 (Consultada en septiembre de 2016).

Dubey, J.P., Carpenter J.L., Speer C.A., Topper, M.J. and Uggla A., 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, May 1: 192:1269-1285

Dubey, J.P., 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 41(1):1-16, doi: 10.3347/kjp.2003.41.1.1 (Consultada en septiembre de 2016).

Dubey, J.P. and Schares, G., 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 140:1–34

Espinoza-Ortega, Angélica, Espinosa-Ayala, Enrique, Bastida-López, J., Castañeda-Martínez, Tirzo and Arriaga-Jordán, Carlos Manuel, 2007. Small-Scale dairy farming in the highlands of central México: technical, economic and social aspects and their impact on poverty. *Expl. Agric.* 43(1):39-65

FAO, FIDA Y PMA (2002) “La reducción de la pobreza y el hambre: La función fundamental de la financiación de la alimentación, la agricultura y el desarrollo rural”, Documento preparado para la Conferencia Internacional sobre la Financiación para el Desarrollo, Monterrey, México. En: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/003/Y6265S/Y6265S00.pdf>

FAO (Food and Agriculture Organization), 2006. “Seguridad Alimentaria”, Informe de Política, Junio de 2006, Número 2 En: ftp://ftp.fao.org/es/ESA/policybriefs/pb_02_es.pdf

FAO (Food and Agriculture Organization), 2014. "El desarrollo del sector lechero" En: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/la-cadena-lactea/el-desarrollo-del-sector-lechero/es/#.V9V9A> (Consultado en septiembre de 2016).

Hernández, J.R., Risco, C., Donovan, A., 2001. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 219(5): 632-635.

Hernández, Morales Patricia, Estrada, Flores Julieta Gertrudis, Avilés, Nova Francisca, Yong, Angel Gilberto, López, González Felipe, Solís, Méndez Alejandra Donaji, Castelán, Ortega Octavio Alonso, 2013. Tipificación de los sistemas campesinos de producción de leche del sur del Estado de México. *Universidad y Ciencia* 29(1):19-31.

INAFED, 2016. Amecameca. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México, En: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15009a.html> (Consultada en septiembre de 2016).

INEGI, 2007. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007, En: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est> (Consultada en septiembre de 2016).

INFOASERCA, 2010. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2010, *Claridades Agropecuarias*, No. 207, pp. 34-43

López, B.J., Arriaga, Jordán Carlos Manuel, González, Díaz J.G., Castelán, Ortega Octavio Alonso y Espinosa, Ortega Angélica, 2008. Variación económica a lo largo del año de los sistemas campesinos de producción de leche y su efecto en los índices de pobreza. *Livestock Research for Rural Development*. 20(2)2008

Mc Dowell, R.E., Camoens, J.K., St Louis, D.G., Cabello, F.E., and Chistiansen, E., 1975. Factors for standardizing lactations records made by Holstein Friesian in México for age and mont. Cornell University AS/IAD, Ithaca, NY, Mimeo 2-75

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Nogareda, C., López-Gatius, F., Santolaria, P., García-Ispuerto, I., Bech-Sabat, G., Pabón, M., Mezo, M., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Yanis, J. and Almería, S., 2007. Dynamics of anti-*Neospora caninum* infection antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. *Vet. Parasitol.* 148(3-4):193-139.

Pingali, Prabhu, Luca Alinovi and Jacky Sutton, 2005. "Food Security in complex emergencies: enhancing food systems resilience. FAO Volum 29, Number S1, p.p. S5-S24. En: http://www.reachingresilience.org/IMG/pdf/food_security_in_complex_emergencies.pdf (Consultada en septiembre de 2016).

Reichel, M.P., Ayanequi-Alcérreca, M.A., Gondim, L.F., Ellis, J.T., 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. *Int. J. Parasitol*, 43(2):133-142. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022. Epub 2012 Dec 12. (Consultada en septiembre de 2016).

Stamoulis, Kostas and Alberto Zezza, 2003. A Conceptual Framework for National Agricultural, Rural Development, and Food Strategies and Policies. ESA Working Paper No. 03-17, En: <http://www.fao.org/docrep/007/ae050e/ae050e00.htm> Consultada en septiembre de 2016).

SAGARPA, 2013. Vacas: Sistemas productivos, En: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/>

Secretaría de Economía, 2012. *Análisis del Sector Lácteo en México*, México: Secretaría de Economía, Dirección General de Industrias Básicas, 29 pp.

Thurmond, M.C. and Hietala, S.K., 1997. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210(5):672-674.

Wilson, D.J., Orsel, K., Waddington, J., Rajeev, M., Sweeny, A.R., Joseph, T., Grigg, M.E., and Raverty, S.A., 2016. *Neospora caninum* is the leading cause of bovine fetal loss in British Columbia, Canada. *Veterinary Parasitology*, 218:46-51, doi: 10.1016/j.vetpar.2016.01.006. Epub 2016 Jan 12. (Consultada en septiembre de 2016).



- INICIO
- ACERCA DE
- ÁREA PERSONAL
- BUSCAR
- ACTUAL
- ARCHIVOS
- AVISOS

Inicio > Usuario/a > Autor/a > **Envíos activos**

Envíos activos

ACTIVOS		ARCHIVADOS			
ID.	DD-MM ENVIAR	SECC.	AUTORES/AS	TÍTULO	ESTADO
1288	11-23	ART	Reyes Sandoval, Ojeda Carrasco,...	DETECCIÓN DE NEOSPORA CANINUM POR PCR ANIDADO EN...	Asignación en espera

Elementos 1 - 1 de 1

Empezar un nuevo envío

HAGA CLIC AQUÍ para ir al primero de los cinco pasos del proceso de envío.

ECOSISTEMAS Y RECURSOS AGROPECUARIOS, Año 3, No. 9, septiembre-diciembre 2016, es una Publicación cuatrimestral editada, publicada y distribuida por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Av. Universidad s/n, Zona de la Cultura, Col. Magisterial, Villahermosa, Centro, Tabasco, CP. 86040, Tel (993) 358 15 00, www.ujat.mx, era@ujat.mx. Editor responsable: Efraín de la Cruz Lázaro. Reservas de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2013-120914331400-102, ISSN: 2007-901X, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Con certificado de licitud de título y contenido No. 16540 otorgado por la Secretaría de Gobernación. Responsable de la última actualización de este Número, Asistente Editorial de la Revista Lic. Misael Hernández Martínez, Av. Universidad s/n, Zona de la Cultura, Col. Magisterial, Vhsa, Centro, Tabasco, Mex. C.P. 86040, fecha de última modificación, 25 de agosto de 2016.

Las opiniones expresadas por los autores no necesariamente reflejan la postura del editor de la publicación.

Queda estrictamente prohibida la reproducción total o parcial de los contenidos e imágenes de la publicación sin previa autorización de la universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

Esta revista esta citada en:

- **ÍNDICE DE REVISTAS MEXICANAS DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA DEL CONACYT** www.conacyt.gob.mx
- **SciELO México** <http://www.scielo.org.mx>
- **Scientific Electronic Library Online Citation Index** (SciELO Citation Index)
- **REDALYC** www.redalyc.org
- **LATINDEX** www.latindex.unam.mx
- **PERIODICA** <http://periodica.unam.mx>
- **EBSCO** <https://www.ebscohost.com>
- **Thomson Gale** www.gale.cengage.com
- **Open Academic Journals Index** <http://oaji.net>
- **Scientific Indexing Services** www.sindex.org
- **Electronic Journals Library**

OPEN JOURNAL SYSTEMS

Ayuda de la revista

USUARIO/A
 Ha iniciado sesión como **juan_jose_ojeda_carrasco**

- Mi perfil
- Cerrar sesión

AUTOR/A
 Envíos

- Activos (1)
- Archivados (1)
- Nuevo envío

NOTIFICACIONES

- Ver (12)
- Administrar

IDIOMA
 Español ▼

CONTENIDO DE LA REVISTA
 Buscar

**DETECCIÓN DE *Neospora caninum* POR PCR ANIDADO EN LEUCOCITOS DE BOVINOS
PRODUCTORES DE LECHE**

(Inglés)

Raúl Miguel Reyes-Sandoval¹, Jesús Antonio Álvarez-Martínez², Carmen Rojas-Martínez², Enrique Espinosa-Ayala¹, Virginia Guadalupe García-Rubio¹, Juan José Ojeda-Carrasco^{1*}

¹Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario Amecameca. Carretera Amecameca-Ayapango Km 2.5, CP. 56900 Amecameca, Estado de México, México.

²Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP. Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla No. 8354 Col. Progreso, CP. 62550, Jiutepec, Morelos. México.

*Autor de correspondencia: jjojedac@uaemex.mx; mvz ojeda@hotmail.com

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue estimar la seroprevalencia y detectar ADN de *Neospora caninum* por medio de PCR anidado en leucocitos de vacas del sistema de producción en pequeña escala en Amecameca, Estado de México. Se estudió un hato conformado por 34 hembras adultas en el que se realizó un seguimiento durante cinco meses haciendo un muestreo de sangre mensual. Se estimó la seropositividad al parásito por medio del ensayo inmunoenzimático y el ADN empleando la PCR en formato anidado con los iniciadores externos Np 21-4 e internos Np 9-10 del gen Nc 5 en leucocitos; adicionalmente, fueron analizadas dos muestras de encéfalo fetal con el mismo protocolo, además de constatar los amplicones en el Genbank. Se estimó la concordancia entre pruebas por la prueba de kappa. La seroprevalencia a *N. caninum* fue 85.3%; fue posible amplificar ADN del parásito a partir de

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

leucocitos de vacas naturalmente infectadas, la prevalencia con PCR fue de 89.4%, por trimestre de gestación de 88.0, 88.9, 87.9 %; el 95 % de las no gestantes y el 100 % de las recién paridas resultaron positivas. Una muestra de encéfalo resultó positiva con la misma prueba. La igualdad de los amplicones osciló entre el 91 y 96 % con lo reportado, el índice kappa fue de 0.41. Se concluye que el empleo de leucocitos aumenta la probabilidad de amplificar ADN de *N. caninum* y los iniciadores propuestos en este estudio pueden ser empleados para muestras sanguíneas, así como de tejido con buenos resultados.

Palabras clave: Detección, leucocitos, *Neospora caninum*, PCR

ABSTRACT

The objective of the research was to estimate seroprevalence and to detect *Neospora caninum* DNA by means of nested PCR in leukocytes from cows from the small-scale production system in Amecameca, State of Mexico. We studied a herd made up of 34 adult females in which it was followed up for five months by sampling monthly blood. Seropositivity to the parasite was estimated by the immunoenzymatic assay and DNA using the PCR in nested format with external primers Np 21-4 and internal Np 9-10 of the Nc 5 gene in leukocytes; In addition, two samples of fetal brain with the same protocol were analyzed, as well as the amplicons in Genbank. The concordance between tests was estimated by the kappa test. The seroprevalence of *N. caninum* was 85.3%; It was possible to amplify DNA from the parasite from leukocytes from naturally infected cows, the prevalence with PCR was 89.4%, per gestation period of 88.0, 88.9, 87.9%; 95% of the non-pregnant women and 100% of the postpartum were positive. A brain sample was positive with the same test. The equality of the amplicons oscillated between 91 and 96% with what was reported, the kappa index was 0.41. It is concluded that the use of leukocytes increases the probability of amplifying *N. caninum* DNA and the initiators proposed in this study can be used for blood samples as well as tissue with good results.

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Keywords: Detection, leucocytes, *Neospora caninum*, PCR

INTRODUCCIÓN

El sistema de producción de leche en pequeña escala (SPLPE) se caracteriza por depender principalmente de mano de obra familiar, poseer entre tres y 35 vacas en producción, hacer un uso escaso o nulo de tecnología (López *et al.* 2008), tener pequeñas superficies de tierra las cuales son cultivadas para proveer alimento al hato; sin embargo, es relevante su gran capacidad de adaptación a los cambios, lo que lo ha convertido en una buena opción para el desarrollo rural (Espinosa *et al.* 2007). En nuestro país el 28% de la producción nacional es aportada por este sistema (Hernández *et al.* 2013) significando que un considerable número de familias dependen de él y al igual que los otros sistemas de producción lechera, éste se ve amenazado por diversos factores que aminoran su funcionalidad, como son el manejo inadecuado, malnutrición, enfermedades metabólicas e infecciosas. Dentro de estas últimas, la enfermedad considerada como la principal causa de aborto bovino a nivel mundial en la actualidad es la neosporosis bovina (Wilson *et al.* 2016) cuyo agente causal es el parásito *Neospora caninum*, un protozooario perteneciente al Phylum Apicomplexa; esta enfermedad se caracteriza por ocasionar aborto entre el tercero y noveno mes de gestación aunque es más común que éste ocurra entre el cuarto y sexto mes; además, puede ocasionar reabsorción embrionaria, muerte fetal temprana, mortinatos y muerte neonatal, provocando un efecto negativo en diferentes parámetros reproductivos y en la producción de leche lo que predispone al desecho prematuro de vacas (Adekunle e Ibikunle 2013). El perro (*Canis familiaris*), el coyote (*Canis latrans*) y otros cánidos silvestres, actúan como hospederos definitivos teniendo un papel importante en la transmisión horizontal de la enfermedad (Dubey *et al.* 2014); con respecto a los hospederos intermediarios han sido reportadas diversas especies entre las que se encuentran principalmente los bovinos, caprinos, ovinos (Dubey *et al.* 2007) y aves domésticas (Costa *et al.* 2008). La detección de

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

anticuerpos específicos contra *N. caninum* es un buen indicador de la exposición de los animales al parásito, la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la prueba de aglutinación, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y el inmunoblot han sido empleados con este fin (Almería 2013); sin embargo, si bien la principal desventaja de este tipo de pruebas es que ninguna de éstas puede detectar la infección en fetos, también resulta importante considerar que la detección de anticuerpos, no necesariamente indica la presencia del parásito al momento de la toma de muestras; así como que la especificidad y sensibilidad diagnóstica de las mismas pueden variar (Yao *et al.* 2009). Respecto al diagnóstico, en la actualidad se dispone de pruebas para el diagnóstico directo como es el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sensibilidad y especificidad elevadas, con la capacidad de amplificar ADN de organismos, en el caso de *N. caninum* a partir de tejidos de fetos abortados o animales adultos, además de fluidos corporales como líquido amniótico, fluido cerebroespinal, sangre, leche y semen (Baszler *et al.* 1999, Yao *et al.* 2009, González-Warleta *et al.* 2014). Aun cuando este tipo de pruebas ofrece grandes posibilidades para el diagnóstico, el procedimiento enfrenta limitantes asociadas a la dificultad para obtener los fetos abortados en buen estado o tejidos que solo pueden ser obtenidos *postmortem*. Además de la baja concentración de parásitos en dichos tejidos, o en fluidos como semen y leche, hacen que la búsqueda de ADN de *Neospora caninum* en sangre sea una buena opción para el diagnóstico de la neosporosis *antemortem* a lo largo de la vida del individuo en cuestión. El gen repetitivo específico Nc-5 y el espaciador de transcripción interno (ITS1) son los marcadores más comúnmente utilizados para la detección de rutina de *N. caninum* basada en PCR (Donahoe *et al.* 2015), utilizando el gen Nc-5 ha sido posible detectar ADN del parásito en la fracción de células blancas de sangre de vacas seropositivas (Okeoma *et al.* 2004, Marques *et al.* 2011), así como en suero de animales seronegativos y seropositivos (Mc Innes *et al.* 2006). Por lo que el objetivo del presente estudio fue estimar la seroprevalencia y detectar ADN de *N. caninum* por medio de PCR anidado en leucocitos de vacas del sistema de producción de leche en pequeña escala (SPLPE).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. La investigación se llevó a cabo en el municipio de Amecameca, ubicado a una altura de 2400 msnm, tiene un clima templado subhúmedo Cb (w2) y la precipitación pluvial promedio de 935 mm, localizado en el sur-oriental del Estado de México (INAFED 1998).

Población bajo estudio. Se trabajó en un hato característico del SPLPE, contando con un total de 34 hembras de fenotipo Holstein en etapa reproductiva, dicho hato previamente se identificó como seropositivo a *N. caninum* (Ojeda-Carrasco *et al.* 2016). Las hembras presentaban diferente número de parto, etapa de la gestación y algunas vacas se encontraron vacías. El seguimiento se realizó de marzo a julio de 2015.

Características del hato. La dieta estuvo basada en ensilado de maíz, forraje de alfalfa, heno de avena y suplementado con alimento balanceado comercial con 18% de proteína cruda; se empleó el pastoreo en praderas artificiales de alfalfa, principalmente en la época de estiaje. El manejo reproductivo se realizó sin modificar el protocolo habitual de la unidad de producción mediante el uso de inseminación artificial. La presencia de otras especies como gansos, palomas, cerdos, équidos y ratas fue observada. Se ha aplicado un programa de vacunación desde 2012, inmunizando contra Brucelosis, Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina, Parainfluenza tipo 3, Virus Sincitial Respiratorio Bovino y Leptospirosis con 5 serovariedades, agentes etiológicos relacionados con la producción de aborto en el bovino. No se permite la entrada de caninos a este hato.

Muestreo. La toma de muestras sanguíneas se efectuó mensualmente durante cinco ocasiones, fue por punción de la vena coccígea utilizando tubos al vacío sin anticoagulante para la prueba de ELISA (sólo en el muestreo inicial) y con EDTA para la PCR. Para la obtención del suero y de los leucocitos

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

(sangre con EDTA) las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 15 min conservado en tubos de poliestireno a -20 ° C hasta su utilización.

ELISA. La detección de anticuerpos específicos contra *Neospora caninum* se llevó a cabo al inicio del estudio y se efectuó mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA) empleando un paquete comercial (HerdCheck anti-*N. caninum*, IDEXX™-Laboratories Inc., Westbrook, Maine USA; con 100 % de sensibilidad y 98.9 % de especificidad) usando una dilución de los sueros de 1:100, cada muestra se analizó por duplicado y la lectura de las placas se verificó con un espectrofotómetro con filtro de absorbancia de 650 nm, tomando 0.50 DO (densidad óptica) como punto de corte de acuerdo a lo especificado por el fabricante.

PCR. La extracción de ADN de los leucocitos se realizó con el paquete comercial (UltraClean BloodSpin™ DNA Isolation kit, MO BIO Laboratories, Inc.) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la PCR sencilla se utilizaron los pares de iniciadores externos del gen Nc-5, Np 21 5' GGG TGT GCG TCC AAT CCT GTA AC 3' y Np 4 5' CCT CCC AAT GCG AAC GAA A 3' que amplifican un fragmento de 380 pares de bases (pb) (Yamaga *et al.* 1996). La mezcla de reacción contenía 12.5 µL de mezcla maestra (PCR Master Mix, Promega™, USA), 1 µL de cada iniciador (10 µM), 2.5 µL de agua libre de nucleasas y 8 µL de ADN blanco para un volumen final de 25 µL. Las condiciones de ciclado fueron: 5 min a 95 °C; 1 min a 94 °C, 1 min a 57 °C, 1 min a 72 °C (35 ciclos); y 7 min a 72 °C. Para la PCR anidada, los iniciadores internos fueron Np 9 5' GTT GCT CTG CTG ACG TGT CGT TG 3' y Np 10 5' CTC AAC ACA GAA CAC TGA ACT CTC G 3' que amplifican un fragmento de 224 pb. (Mc Innes *et al.* 2006). La mezcla de reacción contenía 12.5 µL de mezcla maestra (PCR Master Mix, Promega™, USA), 1 µL de cada iniciador (10 µM), 5.5 µL de agua libre de nucleasas y 5 µL del producto de la PCR sencilla para un volumen final de 25 µL, empleando el siguiente protocolo de ciclado: 5 min a 94 °C; 30 s a 94 °C, 20 s a 63 °C, 30 s a 72 °C (35 ciclos); 10 min a 72 °C (Yao *et al.*

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

2009). Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa al 2.5 % teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta (UV) usando un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific™, O'Gene Ruler 100 pb DNA Ladder). Para el control positivo, se utilizaron taquizoitos extraídos de placas comerciales de IFI (VMRD™) y en el caso del control negativo, agua libre de nucleasas. En el periodo de estudio se registraron dos abortos, el primero de siete meses de gestación proveniente de una vaca de segundo parto y el segundo, de tres meses de gestación de una vaca con un parto, de éstos solo el último se pudo recuperar adecuadamente, éste se mantuvo en refrigeración para el traslado al laboratorio y posterior congelación a -20 °C hasta su utilización; se procesaron dos muestras de 50 mg de diferentes zonas del cerebro que fueron sometidas a la PCR con los iniciadores y protocolos anteriormente descritos.

Secuenciación. Para la purificación de los productos de la PCR se recurrió al uso del paquete comercial (Min Elute Gel Extraction kit™, Qiagen) para su posterior secuenciación. Cuatro muestras de leucocitos y una de encéfalo positivas a la PCR sencilla fueron seleccionadas para su secuenciación automatizada y la posterior comparación con lo publicado por medio de la herramienta BLAST del NCBI, para corroborar la detección de *Neospora caninum*.

Análisis estadístico. La concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR al inicio del estudio, se calculó mediante la prueba Kappa. Para el análisis de los datos, los animales fueron agrupados acorde al estatus serológico, a la detección de ADN de *Neospora caninum* en leucocitos y organizados por mes de gestación o vacas vacías en su caso, así como las que parieron durante el estudio, además de estimar la prevalencia mensual y por trimestre de gestación.

RESULTADOS

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Se estimó una seroprevalencia 85.3 % a *Neospora caninum* en el hato al inicio del estudio por medio de ELISA, las absorbancias registradas con esta prueba para nueve vacas fueron de entre 0.5 y 1, de siete animales de 1.1 a 1.5 y de 13 individuos superiores a 1.51, interpretando dichos valores como contacto reiterado con el agente, ya sea por reactivación de la enfermedad o reinfección.

Fue posible amplificar ADN de *Neospora caninum* a partir de leucocitos de vacas naturalmente infectadas pertenecientes al SPLPE empleando iniciadores diseñados para su uso en suero y tejido tanto en el caso de los iniciadores internos como externos; los resultados de la PCR y el subsecuente análisis de las secuencias demostraron claramente la detección del parásito *Neospora caninum* (Figura 1).

Las prevalencias mensuales estimadas mediante la prueba de PCR fueron de 55.8, 94.1, 100, 97.1, 100 % para los meses de marzo, abril, mayo, junio y julio, respectivamente, promediando un 89.4% para el estudio. Con respecto a la edad de gestación, los resultados se muestran en la Tabla 1.

De dos muestras de cerebro sometidas a la PCR una resultó positiva, el análisis de la secuencia de la muestra reflejó que es 96 % igual a lo publicado en el Genbank (No. de acceso KF649848.1); por su parte, las cuatro secuencias analizadas de leucocitos contaron con 91 a 96 % de igualdad con lo publicado (KF649848.1; AY665719.1). Por otra parte, el índice kappa ($K= 0.41$) indicó concordancia moderada entre la prueba de ELISA y PCR. Durante el muestreo inicial, de cinco vacas seronegativas una resultó positiva por medio de PCR; en contraparte, 11 vacas seropositivas resultaron negativas por la misma prueba; posteriormente, una vaca permaneció negativa a la PCR por dos fechas consecutivas siendo positiva para la tres subsecuentes. Otra de ellas fue positiva en el primer muestreo, negativa en el segundo y positiva los tres posteriores; una más resulto negativa para la primera y cuarta fecha siendo positiva los tres restantes; resaltando que 18 de las 34 hembras bajo estudio resultaron positivas en los cinco muestreos a lo largo de la investigación.

DISCUSIÓN

A nivel internacional las seroprevalencias reportadas a *N. caninum* contrastan de 0.5 % en Suecia (Bartels *et al.* 2006) hasta 46.9 % en Tailandia (Inpankaew *et al.* 2014) y Estados Unidos 49.2 % (Reichel *et al.* 2013) para sistemas de producción de leche intensivos y el único reporte en el SPLPE es de 28.8 % en Uruguay (Furtado *et al.* 2011); por su parte, en el ámbito nacional las prevalencias por serología oscilan entre 16 % (Salinas-Meléndez *et al.* 2005) y 72 % (Morales *et al.* 2001); sin embargo, hasta el momento para el SPLPE, el único reporte de seroprevalencia es de 51.7 %, indicando que más de la mitad de la población ha tenido contacto con *Neospora caninum* en unidades de producción del suroriente del Estado de México (Ojeda-Carrasco *et al.* 2016).

La presencia de *N. caninum* en sangre es de esperarse, ya que ésta provee el medio de transporte para los taquizoitos entre los diferentes tejidos que invade y se ha sugerido que la parte que alberga al parásito es el fragmento de células blancas (Okeoma *et al.* 2004). En México, se ha detectado ADN de *N. caninum* en sangre completa de vacas lecheras del sistema de producción intensivo (Santana *et al.* 2010), de ganado productor de carne (Mondragón-Zavala *et al.* 2011) y en un estudio donde se incluyó ganado productor de carne, leche y de doble propósito en el trópico (Montiel-Peña *et al.* 2011), se reportaron prevalencias del 85, 28 y 33.3 %, respectivamente; no obstante, no se tiene conocimiento de reportes sobre la detección de ADN del parásito en sangre de vacas en el SPLPE por lo que hasta el momento no existe información para comparar los resultados en este sistema de producción ya que el único reporte de detección de ADN en este sistema es en una muestra de cerebro de un feto abortado empleando una prueba de PCR semi anidada (Ojeda-Carrasco *et al.* 2016). Los iniciadores empleados en este estudio no han sido empleados anteriormente en nuestro país en otras investigaciones; sin embargo, los oligos diseñados por Yamage *et al.* (1999), han sido ampliamente utilizados en otros países para la detección del agente a partir de muestras de tejido (Bergeron *et al.*

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

2001) y en suero, en formato simple, semianidado y anidado con buenos resultados, al igual que los diseñados por Mc Innes y colaboradores (2006); por tanto, se demostró que estos pares de cebadores pueden ser usados en la amplificación de ADN del protozooario a partir de leucocitos de vacas infectadas y de tejido fetal, con buenos resultados. Al respecto, se considera que la segunda reacción anidada de PCR aumenta la sensibilidad de la prueba (Yao *et al.* 2009) mientras el semianidado no lo hace cuando es empleado el gen Nc-5 (Baszler *et al.* 1999). Por otra parte, los resultados negativos en la prueba ELISA pueden estar relacionados con una infección primaria temprana en la cual el sistema inmunológico aún no genera una respuesta o bien ésta es de baja intensidad, a la producción de anticuerpos en contra de bradizoitos y la consecuente disminución de los anticuerpos circulantes contra taquizoitos dependiendo de la etapa de infección, además del punto de corte empleado en la prueba o simplemente no se ha tenido contacto con el agente, lo cual resulta poco probable. Para el caso de la PCR los resultados negativos tampoco excluyen la infección por *Neospora caninum*, debido a la reducida cantidad de protozoarios circulantes en la sangre de los hospederos intermediarios y la etapa de infección (Yao *et al.* 2009) o reinfección, todas estas razones pueden explicar por qué algunos animales resultaron positivos a PCR pero negativos a ELISA y viceversa.

Contrariamente a lo realizado por Yao *et al.* (2009), en el presente estudio fue posible detectar una elevada presencia del parásito en sangre de vacas infectadas naturalmente, pudiendo atribuirse a la muestra elegida en el estudio de 2009, ya que el uso de sangre completa coagulada reduce la probabilidad de que esta muestra contenga un número considerable de células de la cuenta blanca al igual que cuando se emplea sangre completa para la extracción de ADN, como es el caso de estudios realizados anteriormente en nuestro país; es por esto que el uso de células blancas para la búsqueda del agente en la presente investigación aumenta la posibilidad de detectar ADN del parásito (Okeoma *et al.* 2004).

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Anteriormente en nuestro país se publicó un estudio en el que se incluyen 20 vacas de primera gestación en sistema intensivo de las cuales se obtuvieron 35, 75 y 50 % de prevalencia en el primer, segundo tercio de gestación y al parto, respectivamente (Santana *et al.* 2010), difiriendo en gran medida con lo encontrado en el presente estudio, pues las prevalencias por tercio de gestación fueron: 88, 88.9, 87.9 %, para el primer, segundo y tercer tercio de la gestación, respectivamente. Adicionalmente se encontró positivas al 100 % de las vacas que parieron durante el lapso de tiempo del estudio; asimismo, se analizaron las vacas vacías resultando de éstas el 93.2 % positivas por medio de la prueba de PCR anidado. En este estudio se detectó ADN del parásito de forma intermitente en algunos de los animales como lo descrito con anterioridad implicando que la presencia del parásito circulante puede variar (Santana *et al.* 2010). Ha sido posible detectar ADN de *Neospora caninum* a partir de la semana once de la gestación y hasta antes del parto en vacas que abortaron y en las que no lo hicieron (Okeoma *et al.* 2005) siendo estos hallazgos similares a lo encontrado en esta investigación a partir del tercer mes de gestación, pero difiriendo en la detección en los dos primeros meses de gestación, indicando esto que el hato bajo estudio se mantiene circulando *N. caninum* continuamente, ya sea de forma vertical por la presencia de abortos y mantenimiento de reemplazos persistentemente infectados, pero también de forma horizontal probablemente por reinfección constante debida al consumo de forraje contaminados durante el pastoreo, ya que el hospedero definitivo se encuentra controlado dentro del hato, pero no así en las praderas destinadas al pastoreo.

Con respecto al análisis del feto abortado recuperado, ha sido descrito que el SNC es el tejido más comúnmente infectado, recomendando además tomar muestras de diferentes lugares ya que la distribución de los quistes dentro de este tejido no es uniforme y además el número de éstos puede ser reducido; resultó positiva una de las dos muestras sometidas a PCR demostrando la infección congénita, la secuenciación de esta muestra resultó 96 % igual a lo publicado anteriormente (No. de

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

acceso KF 649848.1 del Genbank). Datos publicados demuestran que la presencia de anticuerpos contra agentes relacionados con el aborto bovino como *Brucella abortus*, el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina y *Leptospira* spp en el área de estudio es baja comparada con DVB y *Neospora caninum* (Ojeda-Carrasco *et al.* 2016), teniendo en cuenta que el hato estudiado se inmuniza contra los agentes etiológicos anteriores con excepción de *Neospora caninum*, se detectó una elevada seroprevalencia y fue posible detectar ADN del Apicomplexa en la mayoría de las muestras de las vacas, así como en el cerebro del feto recuperado, por lo que es posible atribuir la presencia de abortos por *Neospora caninum*.

Se concluye que la identificación del ADN del parásito *Neospora caninum* mediante la implementación de PCR anidado con los iniciadores externos Np 21 y Np 4, así como los iniciadores internos Np 9 y Np 10 del gen conservado Nc 5 en extractos de leucocitos de muestras de sangre de vacas naturalmente infectadas incrementa la probabilidad de detección del parásito; asimismo, el empleo de los mismos para la amplificación en tejidos fetales debido a una mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica en relación a la prueba de ELISA.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca para la realización de estudios de maestría y a la Secretaría de Educación Pública por el financiamiento del proyecto DSA/103.5/14/7529

LITERATURA CITADA

Adekunle BA and Ibikunle MA (2013) First report of antibodies to *Neospora caninum* in Nigerian cattle.

J. Infect. Dev. Ctries. 7:564-565.

Almería S (2013) *Neospora caninum* and wild life. Hindawi Publishing Corporation.

<http://dx.doi.org/10.5402/2013/947347>

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

- Al-Qassab SE, Reichel MP and Ellis JT (2010). On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum*. *Diversity* 2:411-438.
- Baszler TB, Lawrence JC, Maureen TL, and Bruce AM (1999) Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J. Clin. Microbiology* 37(12) 4059-4064.
- Bergeron N, Girard C, Paré J, Fecteau G, Robinson J and Baillargeon P (2001). Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:173-175.
- Costa KS, Santos SL, Uzeda RS, Pinheiro AM, Almeida MAO, Araujo FR, McAllister MM and Gondim LF (2008) Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 38:157-159.
- Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Slapeta J (2015) A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wild life. *Int. J. Parasitol. P. W.* 4:216-238.
- Dubey JP, Schares G and Ortega-Mora LM (2007) Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *J. Clin. Microbiology.* 20:323-367.
- Dubey JP, Jenkins MC, Ferreira LR, Choudhary S, Verma SK, Kwok OCH, Fetterer R, Butler E and Carstensen M (2014) Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). *Vet. Parasitol.* 201:150-153.
- Espinoza OA, Espinosa AE, Bastida LJ, Castañeda MT and Arriaga JCM (2007) Small-Scale dairy farming in the highlands of Central Mexico: Technical, economic and social aspects and their impact on poverty. *Experimental Agriculture* 43: 1-16.

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

INAFED Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Estado de México. (1998) [en] <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15009a.html>.

Goodswen SJ, Kennedy PJ and Ellis JT (2013) A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution* 13:133-150.

González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Regidor-Cerrillo J, Benavides J, Álvarez-García G, Fuentes M, Ortega-Mora LM and Mezo M (2014) *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Vet. Research* 45:88

Hernández MP, Estrada FJG, Avilés NF, Yong AG, López GF, Solís MAD y Castelán OOA (2013) Tipificación de los sistemas campesinos de producción de leche del sur del estado de México. *Universidad y Ciencia* 29(1): 19-31.

López BJ, Arriaga JC, González DJG, Castelán OOA y Espinosa OA (2008) Variación económica a lo largo del año de los sistemas campesinos de producción de leche y su efecto en los índices de pobreza. *Livestock research for rural development*. 20 (2).

Marques, F.C.A., Headley, A.S., Figueredo-Pereira, V., Taroda, A., Barros, D., Cunha, I.A.L., Munhoz, K., Bugni, F.M., Zulpo, D.L., Igarashi, M., Vidotto, O., Guimaraes, J.S. and Garcia, J.L. (2011). *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitol. Res.* 108:1015-1019.

Mc Innes LR, Ryan LM, O'Handley RO, Sager H, Fershaw D, Palmer DG (2006) Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. *Vet. Parasitol.* 142:207-213.

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Mondragon-Zavala K, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Ramos-Parra M, García-Vázquez Z (2011)

Neospora caninum infection in beef cattle reared under grazing conditions in north-central México. *Rev. MVZ Córdoba* 16(2):2484-2490.

Montiel-Peña T, Romero-Salas D, García-Vázquez Z, Medina-Esparza L y Cruz-Vázquez C (2011)

Neosporosis bovina en ranchos ganaderos de la zona norte del estado de Veracruz, México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 13: 469-479.

Ojeda-Carrasco JJ, Espinosa-Ayala E, Hernández-García PA, Rojas-Martínez C, Álvarez-Martínez JA

(2016) Seroprevalencia de enfermedades que afectan la reproducción de bovinos para leche con énfasis en neosporosis. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 3(8):243-249.

Okeoma CM, Williamson NB, Pomroy WE, Stowell KM and Gillespie L (2004). The use of PCR to

detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. *Vet. Parasitol.* 122:307–315.

Okeoma CM, Stowell KM, Williamson NB and Pomroy WE (2005) *Neospora caninum*: quantification of

DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Exp. Parasitol.* 110, 48–55.

Santana OI, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Ramos PM, Castellanos MC and Quezada GD

(2010) *Neospora caninum*: Detección de ADN en sangre durante la primera gestación de vaquillas infectadas naturalmente. *Vet. Mex.* 41(2):131-137.

Wilson DJ, Orsel K, Waddington J, Rajeev M, Sweeny AR, Joseph T, Grigg ME and Raverty SA (2016)

Neospora caninum is the leading cause of bovine fetal loss in British Columbia, Canada. *Vet. Parasitol.* 218:46-51

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Yamage M, Flechtner O and Gottstein B (1996) *Neospora caninum* specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.* 825(2) 272-279.

Yao L, Yang N, Liu Q, Wang M, Zhang W, Qian WF, Hu YF and Ding J (2009) Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitol.* 136:1251-1256.

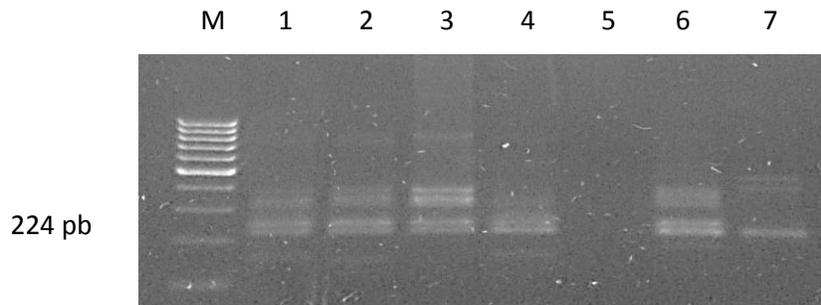


Figura 1. Productos amplificados por PCR anidado con iniciadores Np9 y Np 10 de *N. caninum*. Carriles M) marcador molecular de 100 pb; 1 y 2) Control positivo (taquizoitos), 3) encéfalo de feto 4) vaca 16, 5) Control negativo 6) vaca 17, 7) vaca 26

Tabla 1. Prevalencia a *Neospora caninum* por trimestre de gestación en leucocitos de vacas naturalmente infectadas del SPLPE mediante PCR anidado.

Tercio de la gestación	1º.			2º.			3er			vacía	parto
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Mes de gestación	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
PCR positivas	13	16	15	13	14	13	11	10	6	41	9
PCR negativas	2	3	1	2	2	1	0	1	3	3	0
Total	15	19	16	15	16	14	11	11	9	44	9
% Trimestral	88.0			88.9			87.9			93.2	100

9. CONCLUSIÓN GENERAL

- Las vacas seropositivas a *Neospora caninum* pertenecientes al sistema de producción lechera familiar del municipio de Amecameca producen menor cantidad de leche que las vacas seronegativas
- El uso de la técnica de PCR en su formato anidado con los iniciadores empleados demostró tener mayor sensibilidad que la prueba ELISA cuando se emplean glóbulos blancos en la extracción de ADN, además de poder ser empleada en el diagnóstico en sangre y tejido con buenos resultados.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adekunle, B. A. and Ibikunle, M. A. (2013). First report of antibodies to *Neospora caninum* in Nigerian cattle. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7:564-565.
- Almería, S. and López-Gatius, F. (2009). Aspectos epidemiológicos de la neosporosis bovina en el nordeste español. Una perspectiva clínica. *Información Técnica Económica Agraria ITEA.* 105(4):269-312.
- Almería, S., Araujo, R., Tuo, W., Lopez-Gatius, F., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C., (2010). Fetal death in cows experimentally infected with *Neospora caninum* at 110 days of gestation. *Vet. Parasitol.* 169:304–311.
- Almería, S. (2013) *Neospora caninum* and wild life. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.5402/2013/947347>
- Al-Qassab, S.E., Reichel, M.P., Ellis, J.T. (2010). On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum*. *Diversity* 2:411-438.
- Álvarez, M.J.A., Figueroa, M.J.V., Rojas, M.C., Tapia, G.D. (2004). Detección de *Neospora Caninum* en fetos abortados mediante PCR. Memorias XXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Enfermedades Parasitarias. Morelia, Michoacán. 154-155.
- Anderson, M.L., Palmer, W.C., Thurmond, M.C., Picanso, J.P., Blanchard, P.C., Breitmeyer, R.E., Layto, A.W., McAllister, M., Daft, B., Kinde, H., Read, D.H., Dubey, J.P., Conrad, P.A., Barr, B.C. (1995). Evaluations of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207:1206-1210.
- Antony, A., and Williamson, N.B. (2003). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 51:232–237.
- Atkinson, R. A., Cook, R.W., Reddacliff, L.A., Rothwell, Broady, J.K.W., Harper, P.A.W. and Ellis, J.T. (2000). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Aust. Vet. J.* 78:262–266.
- Bae, J. S., Kim, D.Y., Hwang, W.S. Kim, J.H., Lee, N.S. and Nam, H.W. (2000). Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea. *Korean J. Parasitol.* 38:245–249.
- Barber, J. S., Gasser, R.B., Ellis, J., Reichel, M.P., Mc Millan, D. and Trees, A.J. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J. Parasitol.* 83:1056–1058.
- Barling, K.S., McNeil, J.W., Thompson, J.A., Paschal, J.C., McCollum, F.T., Craig, T.M., Adam, L.G. (2000a). Association of serologic status for *Neospora caninum* with

postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 217:1356-1360.

Barling, K.S., Sherman, M., Peterson, M.J., Thompson, J.A., Mc Neill, J.W., Craig, T.M., Adams, L.G. (2000b) Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 217(9)1361-1365.

Barling, K.S., Mc Neill, J.W., Paschal, J.C., Mc Collum Third, F.T., Craig, T.M., Adams, L.G., Thompson, J.A. (2001) Ranch-Management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. Prev. Vet. Med. 52:53-61.

Bartels, C.J., Arnaiz-Seco, J., Ruiz-Santa-Quitera, A., Björkman, C., Frössling, J., Von Blumröder, D., Conraths, F.J., Schares, G., Van Maanen, C., Wouda, W., Ortega-Mora, L.M. (2006) Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherland, Spain and Sweden. Vet Parasitol. 137:17-27.

Bartley, P.M., Wright, S., Sales, J., Chianini, F., Buxton, D., and Innes, A. (2006). Long-term passage of tachyzoites in tissue culture can attenuate virulence of *Neospora caninum* in vivo. Parasitol. 133:421-432.

Bartley, P.M., Wright, S.E., Maley, S.W., Macaldowie, C.N., Nath, M., Hamilton, C.M., Katzer, F., Buxton, D., Innes, E.A. (2012). Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. Vet. Res. 43(1):38.

Bjerkas, I.M. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and miositis in dogs. Zeitschrift für parasitenkunde, 70(2):271-274.

Buxton, D., McAllister, M.M., Dubey, J.P. (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis. Trends in Parasitol. 18:546-552.

Brand, J.M., Frohn, C., Cziupka, K., Brockmann, C., Kirchner, H., Luhm, J. (2004). Prolactin triggers proinflammatory immune responses in peripheral immune cells. Eur. Cytokine Netw. 15:99-104.

Caetano-da-Silva, A., Ferre, I., Collantes-Fernández, E., Navarro, V., Aduriz, G., Ugarte-Garagalza, C., Ortega-Mora, L.M. (2004). Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. Theriogenology 62:1329-1336.

Castelán-Ortega, O.A., Estrada-Flores, J., Espinoza, O.A., Sánchez, V.E., Ambriz, V.V., Hernández, O.M. (2008). Strategies for the management of agroecosystem resources in temperatures zones of Mexico: the case of campesino milk farmers in the central highlands. En: Castelán, O.O., Bernués, J.A., Ruíz, S.R., Mould, F.L. (Eds.). Opportunities and challenges for smallholder ruminant systems in Latin

America, resource management, food safety, quality and market access. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. pp: 133-160.

Cheah, T. S., Mattsson, J.G., Zaini, M., Sani, R.A., Jakubek, E.B., Uggla, A., Chandrawathani, P. (2004). Isolation of *Neospora caninum* from a calf in Malaysia. *Vet. Parasitol.* 126:263–269.

Bártová, E., Sedlak, K., Budíková, M. (2015). A study of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody seroprevalence in healthy cattle in the Czech Republic. *Ann. Agric. Environ. Med.* 22(1):32-4.

Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Moore, P., Rambeau, M., Unzaga, J.M., Campero, C., Bacigalupe, D., Dubey, J.P. (2001). Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J. Parasitol.* 87:906–907.

Conrad, P.A., Barr, B.C., Sverlow, K.W., Anderson, M., Daft, B., Kinde, H., *et al.*, (1993). *In vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitol.* 106(3):239-249.

Córdova, L.R. (2002). Enfermedades causantes de aborto bovino en Guanajuato. Neosporosis. Memorias del XXVI Congreso Nacional de Buiatría. Enfermedades infecciosas. Acapulco, Guerrero, México.

Córdova, J.A., Xolalpa, C.V., Córdova, J.M., Córdova, J.A., Guerra, L.E. (2007). Factores que predisponen a enfermedades causantes de aborto en vacas lecheras: una revisión. *Rev. Comp. Cienc. Vet.* 2:7-20.

Costa, K.S., Santos, S.L., Uzeda, R.S., Pinheiro, A.M., Almeida, M.A.O., Araujo, F.R., McAllister, M.M., Gondim, L.F. (2008). Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 38:157-159.

Dailey, R.A. (2000). Abortion in dairy cows and heifers. http://www.inform.umd.edu/EdRes/.../ABORTION_IN_DAIRY_COWS_AND_HEIFERS.htm. Consultado en marzo 2016

Davison, H.C., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Williams, D.J.L., Kelly, D.F., Trees, A.J. (2001). Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res. Vet. Sci.* 70:163-168.

Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F.J., Wouda, W., Barkema, H.W. (2001). Dog shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 31:747-752.

Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Beiboer, M.L., Wouda, W. (2003). Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.* 110:161-169

Donahoe, S.L., Lindsay, S.A., Krockenberger, M., Phalen, D., Slapeta, J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wild life. Int. J. Parasitol. P. W. 4:216-238

Dubey, J.P. (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc., 192:1269-1285.

Dubey, J.P., Barr, C.B., Barta, J.R., Bjerkas, I., Bjorkman, C., Blagurn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D.A., Howe, D.K., Jenkins, M.C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A.E., Mattsson, J.G., McAllister, M.M., Modry, D., Omata, Y., Sibley, L.D., Speer, C.A., Trees, A.J., Uggla, A., Upton, S.J., Williams, D.J.L. and Lindsay, D.S. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. Int. J. Parasitol. 30: 929-942.

Dubey, J.P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J. Parasitol. 41:1-16.

Dubey, J.P., Sreekumar, P.C., Knickman, E., Miska, K.B., Vianna, M.C.B., Kwok O.C.H., Hill, D.E., Jenkins, M.C., Lindsay, D.S., and Greene, C.E. (2004). Biologic, morphologic and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates of littermate dogs. Int. J. Parasitol. 34:1157-1167.

Dubey, J.P. and Schares, G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. Vet. Parasitol. 140:1–34.

Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W., (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. J. Comp. Pathol. 134:267–289.

Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. J. Clin. Microbiol. 20:323-367.

Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L.R., Martins, J., Kwok, O.C.H., Choudhary, S. (2011). Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definite host for *Neospora caninum*. Vet. Parasitol. 181:382-387.

Dubey, J.P. and Schares, G., (2011). Neosporosis in animals-the last five years. Vet. Parasitol. 180:90-108.

Escamilla, H.P., Martínez, M.J.J., Medina, C.M., Morales, S.E. (2007). Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro, México. The Canadian Journal of Veterinary Research. 71:314-317.

Espinoza-Ortega, A., Espinosa-Ayala, E., Bastida-López, J., Castañeda-Martínez, T. and Arriaga-Jordán, C. (2007). Small-Scale dairy farming in the highlands of central México: technical, economic and social aspects and their impact on poverty. Expl. Agric. 43(1):39-65.

FAO, FIDA Y PMA (2002) “La reducción de la pobreza y el hambre: La función fundamental de la financiación de la alimentación, la agricultura y el desarrollo rural”, Documento preparado para la Conferencia Internacional sobre la Financiación para el Desarrollo, Monterrey, México. En: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/003/Y6265S/Y6265S00.pdf>

FAO (Food and Agriculture Organization), 2014. “El desarrollo del sector lechero” En: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/la-cadena-lactea/el-desarrollo-del-sector-lechero/es/#.V9V9A> (Consultado en septiembre de 2016).

Ferre, I., Aduriz, G., Del-pozo, I., Regidor-Cerrillo, J., Atxaerandio, R., Collantes-Fernández, E., Hurtado, A., Ugarte-Garagalza, C., Ortega-Mora, L.M. (2005). Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected Bulls. *Theriogenology* 63:1504-1518.

Ghalmi, F., China, B., Ghalmi, A., Hammitouche, D., Losson, B. (2012) Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. *Res. Vet. Sci.* 93:655-661.

García-Ispuerto, I., López-Gatius, F., Almería, S., Yánis, J., Santolaría, P., Serrano, B., Bech-Sabat, G., Nogareda, C., Sulon, J., De Sousa, N.M., Beckers, J.F. (2009). Factors affecting plasma prolactin concentration throughout gestation in high producing dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 36:57-66.

García-Reyna, P.B., Acosta, S.R., Martínez, J.V.M., Galina, H.M., Osnaya, G.F. (2012). Prevalencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en un hato de bovinos productores de leche del estado de México. XXXVI Congreso Nacional de Buiatría, Mérida, Yucatán. 287.

García-Vázquez, Z., Cruz-Vázquez, C., Medina-Espinoza, L., García-Tapia, D., Chavarría-Martínez, B. (2002). Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, México. *Vet. Parasitol.* 106:115-120.

García-Vázquez, Z., Rosario-Cruz, R., Ramos-Aragón, A., Cruz-Vázquez, C., Mapes-Sánchez, G. (2005). *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in México. *Vet. Parasitol.* 134:61-65.

García-Vázquez, Z., Rosario-Cruz, R., Mejía-Estrada, F., Rodríguez-Vivaz, I., Romero-Salas, D., Fernández-Ruvalcaba, M., Cruz-Vázquez, C. (2009). Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle in three southern states of México. *Trop. Anim. Health Prod.* 41:749-753.

Goodswen, S.J., Kennedy, P.J., Ellis, J.T. (2013). A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution* 13:133-150.

Gondim, L.F., Pinheiro, A.M., Santos, P.O., Jesus, E.E., Ribeiro, M.B., Fernandez, H.S., Almeida, M.A., Freire, S.M., Meyer, R., McAllister, M.M. (2001). Isolation of

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

Neospora caninum from the brain of naturally infected dog, and production of encysted bradizoites in gerbils. *Vet. Parasitol.* 101:1-7.

Gondim, L.F., McAllister, M.M., Pitt, W.C., and Zemlicka, D.E. (2004a). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34:159-161.

Gondim, L.F., McAllister, M.M., Anderson-Sprecher, R.C., Bjorkman, C., Lock, T.F., Firkins, L.D., Gao, L., Fischer, W.R. (2004b). Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *J. Parasitol.* 90:1394-1400.

Guerrero, R.R. (2002). Seroprevalencia de neosporosis en establos lecheros del municipio de Tijuana, Baja California. *Memorias del XXVI Congreso Nacional de Buiatría, Enfermedades Infecciosas.*

Gutiérrez, G.J., Cruz-Vázquez, C., Medina E.L., Valdivia, F.A., Islas, O.E., García Vázquez, Z. (2007). Factores de manejo asociados con la seroprevalencia a la infección por *Neospora caninum*, en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Vet. Méx.* 38(3):261-270.

Haerdi, C., Haessig, M., Sager, H., Greif, Staubli, G.D. and Gottstein, B. (2006). Humoral immune reaction of newborn calves congenitally infected with *Neospora caninum* and experimentally treated with toltrazuril. *Parasitol. Res.* 99:534-540.

Hall, C.A., Reichel, M.P., Ellis, J.T. (2005). *Neospora* abortion in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet. Parasitol.* 128:231-241.

Hemphill, A., Vonlaufen, N., Naguleswaran, A. (2006) Cellular and immunological basis of the host-parasite relationship during infection with *Neospora caninum*. *Parasitol.* 133:261-78.

Hernández, J.R., Risco, C., Donovan, A. (2001). Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 34:632-635.

Hernández, M.P., Estrada, F.J.G., Aviles, N.F., Yong, A.G., López, G.F., Solís, M.A.D., Castelán, O.O.A. (2013). Tipificación de los sistemas campesinos de producción de leche del sur del Estado de México. *Universidad y Ciencia* 29(1):19-31.

INAFED, 2016. Amecameca. Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México, En: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM15mexico/municipios/15009a.html> (Consultada en septiembre de 2016).

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

- Innes, E.A., Andrianarivo, A.G., Bjorkman, C., Williams, D.J.L., Conrad, P.A. (2002). Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. Trends in Parasitol. 18:497–504.
- Innes, E.A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macaldowie, C., Esteban-Redondo, I., Buxton, D. (2005). The host–parasite relationship in bovine neosporosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 29–36.
- Kim, J. H., Kang, M.S., Lee, B.C., Hwang, W.S., Lee, C.W., So, B.J., Dubey, J.P. and Kim, D.Y. (2003). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs and raccoon dogs in Korea. Korean J. Parasitol. 41:243–245.
- King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Windsor, P.A. (2010). Australian dingoes are definitive host of *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 40:945-950.
- King, J.S., McAllan, B., Spielman, D.S., Lyndsay, S.A., Hurkova-Hofmannova, L., Hartigan, A., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Slapeta, J. (2011). Extensive production of *Neospora caninum* tissue cysts in a carnivorous marsupial succumbing to experimental neosporosis. Vet. Res. 42:75.
- Klevar, S., Kulberg, S., Boysen, P., Storset, A.K., Moldal, T., Bjorkman, C., Olsen, I. (2007). Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. Int. J. Parasitol. 37:329–339.
- Koiwai, M., Hamaoka, T., Haritani, M., Shimizu, S., Tsutsui, T., Eto, M., and Yamane, I. (2005). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle with reproductive disorders in Japan. Vet. Parasitol. 130:15–18.
- Koudela, B., Svoboda, B., Bjorkman, M.C., and Uggla, A. (1998). Neosporosis in dogs: the first case report in the Czech Republic. Vet. Med. Czech. 43:51–54
- Lasri, S., De Meerschman, F., Rettigner, C., Focant, C., and Losson, B. (2004). Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. Vet. Parasitol. 123:25–32.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P. and Duncan, R.B. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host of *Neospora caninum*. Vet. Parasitol. 82:327-333.
- Lindsay, D.S., Ritter, D.M., and Brake, D. (2001). Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. J. Parasitol. 87:909-911
- López, B.J., Arriaga, J.C., González, D.J.G., Castelán, O.O.A. y Espinosa, O.A. (2008). Variación económica a lo largo del año de los sistemas campesinos de producción de leche y su efecto en los índices de pobreza. Livestock research for rural development. 20(2)2008

López-Gatius, F., López-Béjar, M., Murugavel, K., Pabón, M., Ferrer, D., Almería, S. (2004). *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *J. Vet. Med.* 51:348-352.

López-Gatius, F., García-Ispuerto, L., Santolaria, P., Yánis, J.L., López-Béjar, M., Nogareda, C., Almería, S. (2005). Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. *J. Vet. Med.* 52:147-152.

López-Gatius, F., Almería, S., Donofrio, G., Nogareda, C., García-Ispuerto, I., Bech-Sabat, G., Santolaria, P., Yaniz, J.L., Pabon, M., de Sousa, N.M., Beckers, J.F., (2007). Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Theriogenology* 68:1067-1073.

Lucchese, L., Benkirane, A., Hakimi, I., Idrissi, A., Natale, A. (2016). Seroprevalence estudy of the main causes of abortion in dairy cattle in Morocco. *Vet. Italiana.* 52(1)13-19.

Lyons, R.E., McLeod, R., Roberts, C.W., (2002). *Toxoplasma gondii* tachyzoite bradyzoite interconversion. *Trends in Parasitol.* 18:198–201.

Macaldowie, C., Maley, S.W., Wright, S., Bartley, P., Esteban-Redondo, I., Buxton, D., Innes, E.A. (2004). Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J. Comp. Pathol.* 131:142–156.

Maley, S.W., Buxton, D., Rae, A.G., Wright, S.E., Schock, A., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I., Swales, C., Hamilton, C.M., Sales, J., Innes, E.A. (2003). The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J. Comp. Pathol.* 129:186–195.

Maley, S.W., Buxton, D., Macaldowie, C.N., Anderson, I.E., Wright, S.E., Bartley, P.M., Esteban-Redondo, I., Hamilton, C.M., Storset, A.K., Innes, E.A. (2006). Characterization of the immune response in the placenta of cattle experimentally infected with *Neospora caninum* in early gestation. *J. Comp. Pathol.* 135:130–141.

Marsh, A.E., Barr, B.C., Packham, A.E. and Conrad, P.A. (1998). Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J. Parasitol.* 84:983-991.

Marques, F.C.A., Headley, A.S., Figueredo-Pereira, V., Taroda, A., Barros, D., Cunha, I.A.L., Munhoz, K., Bugni, F.M., Zulpo, D.L., Igarashi, M., Vidotto, O., Guimaraes, J.S., García, J.L. (2011). *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered beef cows (*Bos indicus*). *Parasitol. Res.* 108:1015-1019.

Martínez, L. (2008). Seroprevalencia de la neosporosis bovina en los municipios de Aguadulce, Ixhuatlán, Cosoleacaque y Acayucan ubicados en la zona sur del Estado

de Veracruz, México. Tesis de licenciatura. Veracruz, México: Universidad Veracruzana. 54p

Mc Allister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Joley, W.R., Wills, R.A., and McGuire, A.M. (1998). Dogs are definitive host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 28: 1473-1478.

Mc Guire, A.M., McAllister, M.M., Joley, W.R., Anderson-Sprecher, R.C., (1997a) A protocol for the production of *Neospora caninum* tissue cyst in mice. *J. Parasitol.* 83:647-651.

Mc Guire, A.M., McAllister, M.M., Jolley, W.R., (1997b). Separation and cryopreservation of *Neospora caninum* tissue cysts from murine brain. *J. Parasitol.* 83:319-321.

Mc Innes, L.R., Ryan, L.M., O'Handley, R.O., Sager, H., Fershaw, D., Palmer, D.G. (2006). Diagnostic significance of *Neospora caninum* DNA detected by PCR in cattle serum. *Vet. Parasitol.* 142:207-213.

Mc Innes, L. M., Irwin, P., Palmer, D.G., Ryan, U.M. (2006b). In vitro isolation and characterization of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. *Vet. Parasitol.* 137:355–363.

Medina, E.L., Cruz, V.C., Quezada, T. (2004). Frecuencia de *Neospora caninum* diagnosticada mediante PCR en establos lecheros de Aguascalientes. *Memorias XXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Enfermedades parasitarias.* Morelia, Michoacán. 142.

Medina, L., Cruz-Vázquez, C., Quezada, T., Morales, E., García-Vázquez, Z. (2006) Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, México. *Vet. Parasitol.* 136:187-191.

Medina-Esparza, L., Macías, L., Ramos-Parra, M., Morales-Salinas, E., Quezada, T., Cruz-Vázquez, C. (2013). Frequency of infection by *Neospora caninum* in wild rodents associated with dairy farms in Aguascalientes, México. *Vet. Parasitol.* 191:11-14.

Meléndez-Soto, R.M., Valdivia-Flores, A.G., Rangel-Muñoz, E.J., Díaz-Aparicio, E., Segura-Correa, J.C., Guerrero-Barrera, A.L. (2010). Factores de riesgo asociados a la presencia de aborto y desempeño reproductivo en ganado lechero en Aguascalientes, México. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 1(4):391-401.

Moen, A.R., Wouda, W., Mul, M.F., Graat, E.A.M., Van Werden, T. (1998). Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreak: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 49:1301-1309.

Moore, D. P., Draghi, M.G., Campero, C.M., Cetra, B., Odeón, A.C., Alcaraz, E. and Späth, E.A.J. (2003). Serological evidence of *Neospora caninum* infections in beef

bulls in six counties of the Corrientes province, Argentina. *Vet. Parasitol.* 114:247–252.

Mondragón-Zavala, K., Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L., Ramos-Parra, M., García-Vázquez, Z. (2011). *Neospora caninum* infection in beef cattle reared under grazing conditions in north-central México. *Rev. MVZ Córdoba* 16(2):2484-2490.

Monney, T. and Hemphill, A., (2014). Vaccines against neosporosis: what can learn from the past studies? *Exp. Parasitol.* 140:52-70

Montiel-Peña, T., Romero-Salas, D., García-Vázquez, Z., Medina-Esparza, L. y Cruz-Vázquez, C. (2011). Neosporosis bovina en ranchos ganaderos de la zona norte del estado de Veracruz, México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 13:469-479.

Morales, S.E., Ramírez, L.J., Trigo, T.F., Ibarra, V.F., Puente, C.E., Santa Cruz, M. (1997). Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora* sp. en México. *Vet. Mex.* 28(4):353-357.

Morales, S.E., Trigo, F.J., Ibarra V.F., Puente, C.E., Santacruz, M. (2001a). Seroprevalence study of bovine neosporosis in México. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:413-415.

Morales, S.E. Trigo, F.J., Ibarra V.F., Puente, C.E., Santacruz, M. (2001b). Neosporosis in Mexican dairy herds: Lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. *J. Comp. Pathol.* 125:58-63.

Moskwa, B., Cajab, W., Pastusiak, K., Bien, J. (2003). The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. *Acta Parasitol.* 48:138-141.

Moskwa, B., Pastusiak, K., Bien, J., Cabaj, W. (2007). The first detection of *Neospora caninum* DNA in the calostrum of infected cows. *Parasitol. Res.* 100:633-636.

Muñoz, M.R., Murillo, M.A., Córdova, I.A. (2001). Neosporosis. Un problema reproductivo en hatos de ganado lecheros. *Med. Vet. On line*, 18:376-381.

Nogareda, C., López-Gatius, F., Santolaria, P., García-Ispuerto, I., Bech-Sabat, G., Pabón, M., Mezo, M., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Yanis, J., Almería, S. (2007). Dynamics of anti-*Neospora caninum* infection antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. *Vet. Parasitol.* 148:193-139.

Ojeda, C.J.J., Arrieta, J.C., Brunett, P.L., Espinosa, A.E., Álvarez, M.J.A. (2012). Prevalencia a *Neospora caninum* en bovinos del sistema de producción de leche en pequeña escala en el sur oriente del Estado de México. XXXVI Congreso Nacional de Buiatría, pág. 287.

Ojeda-Carrasco, J.J., Espinosa-Ayala, E., Hernández-García, P.A., Rojas-Martínez, C., Álvarez-Martínez, J.A. (2016). Seroprevalencia de enfermedades que afectan la

reproducción de bovinos para leche con énfasis en neosporosis. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 3(8):243-249.

Okeoma, C.M., Williamson, N.B., Pomroy, W.E., Stowell, k.M., Gillespie, L. (2004). The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. *Vet. Parasitol.* 122:307-315.

Okeoma, C.M., Williamson, N.B., Pomroy, W.E., Stowell, K.M., Gillespie, L.M. (2004b). Isolation and molecular characterization of *Neospora caninum* in cattle in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 52:364–370.

Okeoma, C.M., Stowell, K.M., Williamson, N.B., Pomroy, W.E. (2005). *Neospora caninum*: Quantification of DNA in the blood naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Exp. Parasitol.* 110:48-55.

Ooi, H. K., Huang, C.C., Yang, C.H., and Lee, S.H. (2000). Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle. *Vet. Parasitol.* 90:47–55.

Peregrine, A.S., Duffield, T.F., Wideman, G., Kelton, D., Hobson, J., Cramer, G., Hietala, S.G. (2004). Udder health in dairy cattle infected with *Neospora caninum*. *Prev. Vet. Med.* 64:101-112.

Quinn, H.E., Ellis, J.T., Smith, N.C., (2002). *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol.* 18:391–394.

Quinn, H.E., Miller, C.M.D., Ellis, J.T., (2004). The cell-mediated immune response to *Neospora caninum* during pregnancy in the mouse is associated with a bias towards production of interleukin-4. *I. J. Parasitol.* 34,723–732.

Rivera, G.H. (2001). Causas frecuentes de aborto bovino. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 12(2)117-122.

Reichel, M. P. 1998. Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. *N. Z. Vet. J.* 46:38.

Reichel, M.P., Ayanequi-Alcérreca, M.A., Gondim, L.F., Ellis, J.T. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. *Int. J. Parasitol.* 43:133-142.

Regidor-Cerrillo, J., Arranz-Solís, D., Benavides, J., Gómez-Bautista, M., Castro-Hermida, J.A., Mezo, M., *et al.*, (2014). *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Vet. Res.* 45:10.

Rodríguez, A. A. R., Gennari, S.M., Aguiar, D.M., Sreekumar, C., Hill, D.E., Miska, K.B., Vianna, M.C.B., Dubey, J.P. (2004). Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Vet. Parasitol.* 124:139–150.

Romero-Salas, D., García-Vázquez, Z., Montiel-Palacios, F., Montiel-Peña, T., Aguilar-Domínguez, M., Medina-Esparza, L., Cruz-Vázquez, C. (2010). Seroprevalance of *Neospora caninum* antibodies in cattle in Veracruz, México. *J. Animal and Veterinary Advances*. 9(10) 1445-1451.

Salinas-Meléndez, J.A., Mora-García, J.J., Zárate-Ramos, J.J. Riojas-Valdés, V.M. Hernández-Vidal, G., Dávalos-Aranda, G., Ramírez-Romero, R., Galán-Alejo, L.C., Ávalos-Ramírez, R. (2005). Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en ganado bovino del noreste de México. *Vet. Méx.* 36:303-311.

Sánchez, F., Morales, E., Martínez, J., Trigo, F. (2003). Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from México. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 67: 142-145.

Sánchez-Castilleja, Y.M., Rodríguez-Diego, J.G., Pedroso, M., Cuello, S. (2012). Simultaneidad serológica de *Neospora caninum* con *Brucella abortus* y los virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Diarrea Viral Bovina en bovinos pertenecientes al Estado de Hidalgo, México. *Rev. Salud Anim.* 34(2)95-100.

Santana, O.I., Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L., Ramos, P.M., Castellanos, M.C., Quezada, G.D. (2010). *Neospora caninum*: Detección de ADN en sangre durante la primera gestación de vaquillas infectadas naturalmente. *Vet. Mex.* 41(2)131-137.

Scott, H. M., Sorensen, O., Wu, J.T., Chow, E.Y., Manninen, K., and Van Leeuwen, J.A. (2006). Seroprevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, *Neospora caninum*, bovine leukemia virus, and bovine viral diarrhea virus infection among dairy cattle and herds in Alberta and agroecological risk factors associated with seropositivity. *Can. Vet. J.* 47:981–991.

Schares, G., Barwald, A., Staubach, C., Sondgen, P., Rauser, M., Schroder, R., Peters, M., Wurt, R., Selhorts, T., Conraths, F.J. (2002). P38-activity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet. Parasitol.* 106:293-305.

Serrano, E., Ferre, I., Osoro, K., Aduriz, G., Mateos-Sanz, A., Martínez, A., Atxaerandio, R., Hidalgo, C.O., Ortega-Mora, L.M. (2006). Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. *Vet. Pathol.* 135:197-203.

Serrano-Martínez, E., Ferre, I., Martínez, A., Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Del pozo, I., Aduriz, G., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Ortega-Mora, L.M. (2007). Experimental neosporosis in Bulls: parasites detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology* 67:1175-1184.

Sierra, R.C., Medina-Esparza, L., Parra, M.R., García-Vázquez, Z., Cruz-Vázquez, C. (2011). Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de anticuerpos a

Neospora caninum en ganado lechero de Aguascalientes, México. Rev. Méx. Cienc. Pec. 2(1):15-24.

Staska, L.M., McGuire, T.C., Davies, C.J., Lewin, H.A., Baszler, T.V. (2003). *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. Infect. Immun. 71:3272–3279.

Stoessel, Z., Taylor, L.F., Mc Gowan, M.R., Coleman, G.T., Landmann, J.K. (2003). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* within central Queensland beef cattle. Aust. Vet. J. 81:165–166.

Thompson, G., Canada, N., Do Carmo Topa, M., Silva, E., Vaz, F., Rocha, A. (2001). First confirmed case of *Neospora caninum*-associated abortion outbreak in Portugal. Reprod. Domest. Anim. 36:309–312.

Thurmond, M.C. and 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.

Tiwari, A., Vanleeuwen, J.A., Dohoo, I.R., Keefe, G.P., Haddad, J.P., Tremblay, R., Scott, H.M., Whiting, T. (2007). Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhoea, paratuberculosis, and neosporosis. J. Dairy Sci. 90, 659–669.

Trees A.J. and Williams, D.J.L. (2005). Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends in Parasitol. 21:558-561.

Venturini, M. C., Venturini, L., Bacigalupe, D., Machuca, M., Echaide, I., Basso, W., Unzaga, J.M., Di Lorenzo, C., Guglielmone, A., Jenkins, M.C. and Dubey, J.P. (1999). *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. Int. J. Parasitol. 29:1705–1708.

Vianna, M. C. B., Sreekumar, C., Miska, K.B., Hill, D.E., Dubey, J.P. (2005). Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). Vet. Parasitol. 129:253–257.

Waldner, C. L., Henderson, J., Wu, J.T.Y., Coupland, R., and Chow, E.Y.W. (2001). Seroprevalence of *Neospora caninum* in beef cattle in northern Alberta. Can. Vet. J. 42:130–132.

Williams, D.J., Guy, C.S., Smith, R.F., Guy, F., McGarry, J.W., McKay, J.S., Trees, A.J. (2003). First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. Int. J. Parasitol. 33:1059-1065.

Williams, D.J.L. and Trees, A.J., (2006). Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum*-infected cattle. Parasite Immunology 28:61–67.

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

- Williams, D.J., Hartley, C.S., Björkman, C., Trees, A.J. (2009). Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitol.* 136(14):1895-900
- Wilson, D.J., Orsel, K., Waddington, J., Rajeev, M., Sweeny, A.R., Joseph, T., Grigg, M.E., Raverty, S.A. (2016). *Neospora caninum* is the leading cause of bovine fetal loss in British Columbia, Canada. *Vet. Parasitol.* 218:46-51
- Wouda, W., Bartels, C.J.M., Moen, A.R. (1999). Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology* 52:233-245.
- Yamage, M., Flechtner, O., Gottstein, B. (1996). *Neospora caninum* specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J. Parasitol.* 825(2) 272-279.
- Yao, L., Yang, N., Liu, Q., Wang, M., Zhang, W., Qian, W.F., Hu, Y.F., Ding, J. (2009). Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitol.* 136:1251-1256.
- Yaniz, J.L., López-Gatius, F., García-Ispuerto, I., Bech-Sabat, G., Serrano, B., Nogareda, C., Sánchez-Nadal, J.A., Almería, S., Santolaria, P. (2010). Some factors affecting the abortion rate in dairy herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions are different in cows and heifers. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 699–705.

11. ANEXOS

11.1 Anexo I.

Ensayo Inmunoenzimático Ligado a Enzimas

(HerdCheck anti-*N. caninum*, IDEXX™-Laboratories Inc., Westbrook, Maine USA; con 100 % de sensibilidad y 98.9 % de especificidad)

La solución de lavado está a una concentración de 10X por lo que es necesario hacer la dilución antes de empezar con el procedimiento.

Preparación de los sueros problema

Registrar la posición de cada muestra por duplicado incluyendo controles positivo y negativo en los pozos A1; A2 y B1; B2 respectivamente.

Hacer la dilución de los sueros 1:100 utilizando el diluyente para la muestra incluido en el kit.

Nota: los controles no se diluyen, están listos para su uso.

- Dejar que los reactivos alcancen una temperatura entre 18-26°C, agitar antes de su uso
- Identificar los pozos destinados a los controles y los destinados a las muestras
- Colocar 100 µl del control positivo sin diluir en los dos pozos
- Colocar 100 µl del control negativo sin diluir en los dos pozos
- Verter 100 µl de los sueros problema diluidos en los pozos correspondientes
- Incubar durante 30 min a temperatura ambiente
- Desechar el líquido de todos los pozos
- Lavar cada pozo 4 veces agregando 300 µl de solución de lavado golpeando firmemente sobre papel absorbente. Evitar que la placa se seque entre cada lavado y la aplicación del conjugado
- Agregar 100 µl de conjugado en cada pozo, incubar 30 min a temperatura ambiente
- Desechar el líquido de todos los pozos

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

- Lavar cada pozo 4 veces agregando 300 µl de solución de lavado golpeando firmemente sobre papel absorbente. Evitar que la placa se seque entre cada lavado y la aplicación del sustrato
- Añadir 100 µl del sustrato TMB en cada pozo
- Incubar 15 minutos a temperatura ambiente
- Agregar 100 µl de solución de frenado en cada pozo
- Medir y registrar la absorbancia a 650 nm
- Calcule los resultados

Cálculos

$$\text{Media del control negativo} = \frac{CN1+CN2}{2}$$

$$\text{Media del control positivo} = \frac{CP1+CP2}{2}$$

$$\text{Cálculo del cociente (MP)} \quad MP = \frac{\text{muestra A (650)} - CN}{CP - CN}$$

11.2 Anexo II.

Extracción de ADN de muestras sanguíneas

(UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation kit, MO BIO Laboratories, Inc.)

- Homogenizar las muestras y depositar 200 µl en microtubos bien identificados
- Agregar 1000 µl de solución de saponina al 1%, homogenizar la mezcla por agitación durante 30 segundos, centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos, desechar el sobrenadante conservando el botón celular
- Repetir el paso anterior las veces que sea necesario hasta obtener el sobrenadante claro y transparente
- Desechar el sobrenadante y conservar el botón celular
- Agregar 10 µl de proteinasa K y 200 µl de la solución de B1, agitar 15 segundos
- Incubar la muestra 10 min a 65°C
- Adicionar 200 µl de la solución B2 y mezclar por agitación 15 segundos, centrifugar brevemente
- Transferir el lisado a una columna de extracción y centrifugar 1 min a 13000 rpm
- Trasladar la columna de extracción a un nuevo tubo colector
- Colocar 500 µl de la solución B3 en la columna de extracción y centrifugar 30 seg a 13000 rpm
- Remover la columna de extracción y descartar el fluido, colocar la columna de extracción en el mismo tubo colector
- Agregar 500 µl de la solución B4 a la columna, centrifugar 30 seg a 13000 rpm
- Remover la columna de extracción y descartar el fluido, colocar la columna de extracción en el mismo tubo colector
- Centrifugar nuevamente 30 seg a 13000 rpm para secar la columna
- Cuidadosamente transferir la columna a un nuevo tubo colector

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

- Agregar 60 µl de la solución B5 al centro de la columna e incubar 5 min a 65°C
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm
- Identificar y conservar en congelación a – 20°C hasta su uso

11.3 Anexo III.

Extracción de ADN a partir de muestras de tejido fetal

(UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation kit, MO BIO Laboratories, Inc.)

- Pesar 50 mg. de tejido utilizando material estéril
- Depositar el tejido en microtubos de 2 mililitros (ml) y macerar gentilmente procurando la esterilidad
- Agregar 10 µl de proteinasa K y homogenizar la mezcla
- Adicionar 200 µl de la solución de lisis B1 y agitar 15 segundos
- Incubar la muestra 10 minutos (min.) a 65°C
- Añadir 200 µl de la solución B2 y mezclar por agitación 15 segundos, centrifugar brevemente
- Transferir el lisado a una columna de extracción y centrifugar 1 min a 13000 rpm
- Trasladar la columna de extracción a un nuevo tubo colector
- Colocar 500 µl de la solución B3 en la columna de extracción y centrifugar 30 segundos (seg) a 13000 rpm
- Remover la columna de extracción y descartar el fluido, colocar la columna de extracción en el mismo tubo colector
- Agregar 500 µl de la solución B4 a la columna, centrifugar 30 seg a 13000 rpm
- Remover la columna de extracción y descartar el fluido, colocar la columna de extracción en el mismo tubo colector
- Centrifugar 30 seg a 13000 rpm para secar la columna
- Cuidadosamente transferir la columna a un nuevo tubo colector
- Agregar 60 µl de la solución B5 al centro de la columna e incubar 5 min a 65°C
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm
- Identificar y conservar en congelación a – 20°C hasta su uso

11.4 Anexo IV.

Extracción de ADN de placas de inmunofluorescencia

(Taquizoitos, control positivo PCR)

(UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation kit, MO BIO Laboratories, Inc.)

Se utilizan placas de inmunofluorescencia ya utilizadas

- Envolver las placas de inmunofluorescencia en papel absorbente y aplicar presión moderada sobre las mismas por un periodo de 48 horas
- Repetir el paso anterior
- Aplicar 5 µl de la solución B1 en cada pozo e incubar en cámara húmeda durante 10 minutos a 36°C.
- Retirar la solución raspando la superficie de la placa y depositarla dentro de un microtubo, repetir el paso anterior dos veces
- Centrifugar la muestra 15 seg
- Agregar 9 µl de proteinasa K y 180 µl de la solución de B1, agitar 15 segundos
- Incubar la muestra 10 min a 65°C
- Adicionar 180 µl de la solución B2 y mezclar por agitación 15 segundos, centrifugar brevemente
- Transferir la solución a una columna de extracción y centrifugar 1 min a 13000 rpm
- Trasladar la columna de extracción a un nuevo tubo colector
- Colocar 450 µl de la solución B3 en la columna de extracción y centrifugar 30 seg a 13000 rpm
- Remover la columna de extracción y descartar el fluido, colocar la columna de extracción en el mismo tubo colector
- Agregar 450 µl de la solución B4 a la columna, centrifugar 30 seg a 13000 rpm
- Remover la columna de extracción y descartar el fluido, colocar la columna de extracción en el mismo tubo colector
- Centrifugar nuevamente 30 seg a 13000 rpm para secar la columna
- Cuidadosamente transferir la columna a un nuevo tubo colector

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

- Agregar 60 µl de la solución B5 al centro de la columna e incubar 5 min a 65°C
- Centrifugar 1 min a 13000 rpm
- Identificar y conservar en congelación a – 20°C

11.5 Anexo V.

Reacción en cadena de la polimerasa anidado

Para la técnica de PCR anidado se emplearon los pares de iniciadores externos **Np 4** 5´CCT CCC AAT GCG AAC GAA A 3´ **Np 21** 5´ GGG TGT GCG TCC AAT CCT GTA AC 3´ (Yamaga *et al.*, 1996) que amplifican un fragmento de 380 pb del gen Nc-5 e internos **Np 9** 5´ GTT GCT CTG CTG ACG TGT CGT TG 3´ **Np 10** 5´ CTC AAC ACA GAA CAC TGA ACT CTC G 3´ (Mc Innes *et al.*, 2006) que amplifican un fragmento de 228 pb del mismo gen.

Las reacciones de PCR para la primera amplificación se realizaron a un volumen final de 25 µl, conteniendo:

- 12.5 µl de master mix (Promega)
- 1 µl de iniciador Np 4
- 1 µl de iniciador Np 21
- 2.5 µl de agua libre de nucleasas
- 8 µl de ADN

Para las reacciones de PCR de la segunda amplificación se usaron los siguientes volúmenes.

- 12.5 µl de master mix (Promega)
- 1 µl de iniciador Np 4
- 1 µl de iniciador Np 21
- 5.5 µl de agua libre de nucleasas
- 5 µl de la amplificación inicial

El protocolo de amplificación para el primer fragmento fue de una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min seguido de 35 ciclos con 94°C por 1 min para desnaturalización, 57°C por un min para el alineamiento y 72°C por un minuto para la extensión, seguido por un ciclo de extensión final a 72°C durante 7 min para su posterior conservación a 4°C. Para el segundo fragmento se realizó una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min continuando con 35 ciclos a 94°C durante 30 seg en la desnaturalización, 63°C durante 20 seg para la extensión y para el alineamiento a 72°C por 30 seg y una extensión final a 72°C durante 10 minutos

DETECCIÓN DE *Neospora caninum* MEDIANTE PCR EN SANGRE Y SU ASOCIACIÓN CON LA
PRODUCCIÓN LÁCTEA EN BOVINOS

(Yao *et al.*, 2009). Se utilizó como control positivo ADN de taquizoitos extraído de placas de IFI y/o ELISA y como control negativo agua libre de nucleasas