



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Tecnológico Nacional de México

Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes

Instituto Tecnológico de Tlajomulco

Programa Multisede

Tesis Doctoral

EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR *Neospora caninum* EN PERROS DE AGUASCALIENTES, MÉXICO

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en Biotecnología en Procesos Agropecuarios

Presenta:

M.C. María Isabel de Velasco Reyes

Director de Tesis:

Dr. Carlos Ricardo Cruz Vázquez

El Llano, Aguascalientes, México. Noviembre de 2020.





"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita madre de la patria"

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DICTAMEN DE TESIS APROBADA

El Llano, Ags., a 23/noviembre/2020

El Comité de Tesis del Candidato a grado **C. MARÍA ISABEL DE VELASCO REYES**, aprobado por el Claustro Doctoral de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes e Instituto Tecnológico de Tlajomulco; integrado por los C. Dr. Carlos Ricardo Cruz Vázquez, Dra. Leticia Esperanza Medina Esparza, Dra. Irene Victoria Vitela Mendoza, Dr. Juan Florencio Gómez Leyva y Dr. César Andrés Ángel Sahagún, habiéndose reunido a fin de evaluar el trabajo final de la tesis titulada: **"Epidemiología de la infección por Neospora caninum en perros de Aguascalientes, México"**, que presenta como requisito parcial para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biotecnología en Procesos Agropecuarios, según lo establecen los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado del TecNM, y de acuerdo a las Bases para la Elaboración de Tesis de Posgrado, dictaminaron su **APROBACIÓN** para que pueda ser presentada en el Examen de Grado correspondiente.

ATENTAMENTE

"Terra Rica, Sapientia Nostra, Homo Superior Est"

Dr. Carlos Ricardo Cruz Vázquez
Director de Tesis

Vo. Bo.

Dra. Leticia Esperanza Medina Esparza
Asesora

Dr. Juan Florencio Gómez Leyva
Asesor

Dra. Irene Victoria Vitela Mendoza
Asesora

Dr. Cesar Andrés Ángel Sahagún
Asesor

C.c.p.- Claustro Doctoral de la DEPI.
C.c.p.- Archivo



CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de El Llano, Aguascalientes el día 15 del mes de octubre del año 2020, la que suscribe, María Isabel de Velasco Reyes, alumna del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Procesos Agropecuarios con número de control D16900001, adscrita al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, manifiesta ser autora del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Carlos Ricardo Cruz Vázquez, y cede los derechos del trabajo intitulado "Epidemiología de la infección por *Neospora caninum* en perros de Aguascalientes, México", y de patentes y beneficios que puedan originarse del presente, al Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes.

ATENTAMENTE



María Isabel de Velasco Reyes

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, por cada minuto de enseñanza.

Al comité de tesis por su apoyo y colaboración.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y al Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes por su apoyo y formación.

Al Centro de Control, Atención y Bienestar Animal por su colaboración.

A todos los doctores, maestros que me ayudaron en cada etapa de este trabajo, gracias por dedicarme un tiempo y compartirme sus conocimientos.

DEDICATORIA

A mi hija, a mi pequeña Ariadna que siempre confió en mí y me mantuvo firme.

A mi familia, mi madre que siempre estuvo conmigo. A mi padre, gracias por ser mi ángel guardián.

Amor gracias por tu apoyo, tus horas de trabajo, por decirme una y otra vez que sí, por tu paciencia y sobre todo por confiar que llegaríamos al final.

SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA

°C Grados celsius

G Gramos

H Hora

kg Kilogramo

L Litro

mL Mililitro

μm Micrómetro

μl Microlitro

% Por ciento

IFI Inmunofluorescencia Indirecta

ELISA Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

UPL Unidades de Producción Lechera

PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa

CPS Coproparasitoscópico

nm Nanómetros

RESUMEN

Con el objetivo de estudiar la epidemiología de la infección natural por *Neospora caninum* en perros del estado de Aguascalientes, se muestrearon una vez al mes, durante seis meses 24 perros que convivían estrechamente con ganado de ocho Unidades de Producción Lechera seropositivas al parásito. Se tomó una muestra de suero para procesarlo mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y otra de sangre periférica para identificar ADN del parásito. Se aplicó una encuesta a los propietarios para conocer rasgos del manejo y comportamiento de los perros, se estimó la asociación de la seroprevalencia con algunos factores de riesgo mediante regresión logística. La prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en el primer muestreo fue 54% (13/24; 95% I.C. 33-73) y en el último 62% (15/24; 95% I.C. 40-80); la incidencia fue de 8.69%. En ningún muestreo fue posible detectar la presencia de ADN del parásito en sangre. La edad (> 6 años), fue identificado como factor de riesgo a contraer la infección; con ninguna otra variable fue posible identificar una asociación estadísticamente significativa ($p>0.05$). Con el objetivo de detectar ooquistes-like en heces e identificar la presencia de quistes y ADN de *N. caninum* en tejidos, se muestrearon en el Centro de Control, Atención y Bienestar Animal del municipio capital, 15 perros provenientes de comunidades rurales, así como nueve de áreas suburbanas, tomando muestras de tejido encefálico (cerebro y cerebelo), suero y heces. El tejido encefálico se procesó para identificar la presencia de ADN del parásito, y por histopatología convencional para la detección de lesiones y/o quistes de *N. caninum*; el suero mediante IFI y las heces por coprología y PCR. En ningún caso se detectó ADN del parásito en tejido encefálico; el estudio histológico no reveló ninguna lesión sugestiva y/o quiste de *N. caninum*. La seroprevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* fue 54% (13/24; 95% I.C. 35-72). La frecuencia en la detección de ooquistes-like de *N. caninum* fue 8% (2/24; 95% I.C. 2-25) siendo estos seropositivos, mientras que por PCR ninguna de las muestras de heces amplificó el fragmento deseado.

ABSTRACT

In order to study the epidemiology of natural infection by *Neospora caninum* in dogs from the state of Aguascalientes, 24 dogs living closely with cattle from eight Dairy Production Units seropositive to the parasite were sampled once a month for six months. A serum sample was taken for processing by Indirect Immunofluorescence (IFI) and a sample of peripheral blood to identify DNA from the parasite. A survey was carried out on the owners to find out the handling and behavioral traits of the dogs, the association of seroprevalence with some risk factors was estimated using logistic regression. The prevalence of antibodies anti-*N. caninum* in the first sampling was 54% (13/24; 95% I.C. 33-73) and in the last 62% (15/24; 95% I.C. 40-80); the incidence was 8.69%. In no sampling was it possible to detect the presence of parasite DNA in blood. Age (> 6 years) was identified as a risk factor for contracting the infection; with no other variable it was possible to identify a statistically significant association ($p > 0.05$). Aiming to detect oocyst-like in stool and identify the presence of *N. caninum* cysts and DNA in tissues, they were sampled at the Center for Control Attention and Animal Welfare of the capital municipality, 15 dogs from rural communities, as well as nine from suburban areas, taking samples of brain tissue (brain and cerebellum), serum and feces. The brain tissue was processed to identify the presence of DNA from the parasite, and by conventional histopathology for the detection of lesions and / or cysts of *N. caninum*; serum by IFI and feces by coprology and PCR. In no case was DNA from the parasite detected in brain tissue; the histological study did not reveal any suggestive lesion and / or cyst of *N. caninum*. The seroprevalence of antibodies anti-*N. caninum* was 54% (13/24; 95% I.C. 35-72). The frequency in detection of *N. caninum* oocysts was 8% (2/24; 95% I.C. 2-25), being these seropositive, whereas by PCR none of the feces samples amplified the desired fragment.

ÍNDICE GENERAL

	página
DICTAMEN DE TESIS APROBADA	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
SÍMBOLOS Y NOMENCLATURA	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
3. HIPÓTESIS	4
4. OBJETIVOS	5
4.1 Objetivo General	5
4.2 Objetivos Específicos	5
5. REVISIÓN DE LITERATURA	6
5.1 Definición neosporosis	6
5.2 Antecedentes	6
5.3 Clasificación Taxonómica	7
5.4 Morfología	7
5.5 Ciclo biológico	8
5.6 Neosporosis en perros	10
5.7 Técnicas de diagnóstico de <i>N. caninum</i>	12
5.7.1 Técnicas de diagnóstico indirecto	13
5.7.2 Técnicas de diagnóstico directo	13
5.8 Epidemiología	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Lugar de estudio	20
6.2 Desarrollo del estudio	20
6.2.1 Primera etapa	20
6.2.1.1 Selección de los animales	20
6.2.1.2 Toma de muestras	21
6.2.1.3 Recopilación de información	22
6.2.1.4 Serodiagnóstico	22

6.2.1.5 Detección de ADN de <i>N. caninum</i> en sangre periférica	23
6.2.1.6 Análisis de la información	23
6.2.2 Segunda etapa	24
6.2.2.1 Selección de animales	24
6.2.2.2 Toma de muestras	24
6.2.2.3 Detección de ADN de <i>N. caninum</i> en tejido	26
6.2.2.4 Detección de lesiones y/o quistes de <i>N. caninum</i> en tejido	26
6.2.2.5 Detección de anticuerpos anti- <i>N. caninum</i>	26
6.2.2.6 Coprología y detección de ADN de <i>N. caninum</i> en heces	27
6.2.2.7 Análisis de la información	27
6.2.2.8 Coyote (<i>Canis latrans</i>)	27
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1 Primera etapa	29
7.2 Segunda etapa	34
8. CONCLUSIONES	47
9. LITERATURA CITADA	48
ANEXOS	61
1 Cédula de Identificación Unidad de Producción Lechera	61
2 Cédula de Identificación perro	62
3 Cédula de Identificación perro/ necropsia CCABA	63
4 Artículo publicado (Journal of Parasitology)	64

ÍNDICE DE CUADROS

	página
Cuadro 1. Prevalencia de anticuerpos anti- <i>N. caninum</i> en perros	15
Cuadro 2. Prevalencia de ooquistes-like de <i>N. caninum</i> en heces de perro	18
Cuadro 3. Prevalencia y títulos de anticuerpos anti- <i>N.caninum</i> en la población bajo estudio.	30
Cuadro 4. Seroprevalencia de la infección por <i>N. caninum</i> para las diferentes categorías en cada variable bajo estudio.	31
Cuadro 5. Resultados de los diferentes estudios diagnósticos en la muestra de perros incluidos en la segunda etapa del estudio.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
Figura 1. Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i>	10
Figura 2. Gel de agarosa al 2.5% con los productos de amplificación de la PCR con los iniciadores Np21/Np6 para <i>N. caninum</i>	35
Figura 3. Corte histológico de médula de cerebro de perro (HE)	36
Figura 4. Corte histológico de la corteza de cerebelo de perro (HE)	36
Figura 5. Ooquiste-like de <i>N. caninum</i> en flotación con solución salina saturada (100x)	37
Figura 6. Gel de agarosa al 2.5% con los productos de amplificación de la PCR con los iniciadores Np21/Np6 para <i>N. caninum</i> en muestras de coyote (<i>Canis latrans</i>)	40
Figura 7. Corte histológico de cerebro de coyote (<i>Canis latrans</i>) HE	41
Figura 8. Resultados del examen coprológico de coyote (<i>Canis latrans</i>)	42

1. INTRODUCCIÓN

Neospora caninum, es un parásito protozooario intracelular del phylum Apicomplexa causante de la enfermedad conocida como neosporosis, la cual provoca principalmente desórdenes neuromusculares en perros y aborto en ganado bovino; su ciclo biológico es heteroxeno, en el cual el perro doméstico y el coyote aparecen como los principales huéspedes definitivos, mientras que el ganado bovino así como un amplio rango de animales tanto domésticos como silvestres, pueden actuar como huéspedes intermediarios (Dubey y Schares 2011). El carnivorismo es la principal ruta de infección en los perros, que al consumir abortos, tejidos placentarios y carne cruda de animales infectados con el parásito, desarrollan una fase de infección entérica donde el perro elimina en las heces ooquistes sin esporular, que al estar en el medio ambiente esporulan, contaminando agua y alimento que consume el ganado, que de esta manera adquiere la infección; en tanto que una hembra infectada de forma crónica puede transmitir el parásito al feto a través de la placenta de forma altamente eficiente, este último mecanismo es responsable de la perpetuación de la infección en los hatos (Dubey y Schares 2011; Goodswen *et al.*, 2013).

En el ganado lechero, *N. caninum* puede provocar muerte fetal temprana, reabsorción embrionaria, muerte neonatal y abortos, principalmente en el segundo tercio de la gestación, afectando con ello los parámetros reproductivos, el programa de reemplazos de la empresa y la producción de leche (Almería y López-Gatius, 2013). La neosporosis bovina es reconocida como una de las principales causas de aborto en ganado lechero a nivel mundial, estimándose pérdidas anuales por 842.9 millones de dólares (Reichel *et al.*, 2013; Guido *et al.*, 2016).

En México, la presencia de *N. caninum* ha sido documentada en ganado bovino (García-Vázquez *et al.*, 2005, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2007; Romero-Salas *et al.*, 2010), ovino (Castañeda-Hernández *et al.*, 2014; Romo-Gallegos *et al.*, 2019), así como en perros (Sánchez *et al.*, 2003; Cruz-Vázquez *et al.*, 2008), y algunas especies silvestres (Gondim *et al.*, 2006; Olamendi-Portugal *et al.*, 2012; Medina-Esparza *et al.*, 2013), considerándose una importante enfermedad reproductiva que causa pérdidas por 68.5 y 94.8 millones de dólares anuales en la industria lechera y de la carne, respectivamente (Reichel *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICACIÓN

El perro desempeña un papel fundamental en la epidemiología de la neosporosis al ser el hospedero definitivo de *N. caninum*, confirmado por la eliminación de ooquistes (McAllister *et al.*, 1998). De esta forma, los perros representan un factor de riesgo en la transmisión de la infección por *N. caninum* en los hatos de producción lechera y de otros hospederos intermediarios (Basso *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2007). Diversos estudios epidemiológicos han identificado la presencia de perros en unidades de producción ganadera como un factor de riesgo para la neosporosis bovina y han proporcionado evidencia para la ocurrencia de la transmisión horizontal al ganado, principal responsable de la ocurrencia de abortos (Dubey *et al.*, 2007).

Varios estudios han reportado la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en perros, observando que la prevalencia tiende a ser mayor en perros domiciliados en establos que en perros que viven en áreas urbanas (Dubey y Schares, 2011). Sin embargo, pocos reportes describen la presencia de ooquistes en las heces de los perros que están infectados de forma natural (Basso *et al.*, 2001; Slapeta *et al.*, 2002; McGarry *et al.*, 2003; Schares *et al.*, 2005), en Aguascalientes se ha reportado el 40% de seroprevalencia en perros que viven en estrecho contacto con ganado lechero (Cruz-Vázquez *et al.*, 2008).

Considerando lo anterior, aún se desconocen diversos rasgos epidemiológicos de la infección natural en perros que conviven con el ganado, como de perros de áreas rurales y suburbanas; del mismo modo, de reportes en la identificación de casos de perros con eliminación de ooquistes en heces, además de la eventual presencia de quistes del parásito en tejido encefálico en los mismos perros, elementos que pueden ayudar a comprender de mejor manera los mecanismos de transmisión y mantenimiento de la infección.

3. HIPÓTESIS

H₀: La infección natural por *N. caninum* es de alta prevalencia en perros asociados a unidades de producción ganadera en el estado de Aguascalientes, así como en perros de áreas suburbanas y rurales del municipio capital.

H₁: La infección natural por *N. caninum* no es de alta prevalencia en perros asociados a unidades de producción ganadera en el estado de Aguascalientes, así como en perros de áreas suburbanas y rurales del municipio capital.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Estudiar la epidemiología de la infección natural por *Neospora caninum* en diferentes poblaciones caninas en el estado de Aguascalientes.

4.2 Objetivos Específicos

- Estudiar la seroepidemiología de la infección en una población de perros asociada a Unidades de Producción Lechera (UPL).
- Monitorear la dinámica de anticuerpos anti-*N.caninum* e identificar la frecuencia de detección de ADN en sangre de perros asociados a UPL con una frecuencia mensual durante seis meses.
- Identificar la seroprevalencia en una población de perros de áreas suburbanas y rurales.
- Detectar la frecuencia de ooquistes-like de *N. caninum* en heces de perros de áreas suburbanas y rurales, mediante técnicas parasitológicas y moleculares.
- Identificar la presencia de quistes y ADN del parásito en tejidos provenientes de perros de áreas suburbanas y rurales, mediante la aplicación de diversas técnicas diagnósticas.

5. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1 Definición neosporosis

La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por el protozoario *N. caninum* (Apicomplexa, Sarcosistidae) que afecta a una amplia gama de animales domésticos y silvestres; los huéspedes definitivos identificados son el perro doméstico (McAllister *et al.*, 1998), dingo australiano (King *et al.*, 2010), el coyote (Gondim *et al.*, 2004a) y el lobo gris (Dubey *et al.*, 2011), mientras que un gran número de animales domésticos y silvestres, puede servir como huéspedes intermediarios.

Este protozoario provoca en los perros meningoencefalitis, poliradiculoneuritis y polimiositis (Barber, 1998; Dubey *et al.* 2007; Lyon, 2010), y en algunos casos dermatitis piogranulomatosa (Dubey *et al.*, 1995).

5.2 Antecedentes

En el año 1984, tres Médicos Veterinarios de origen noruego, Bjerkås, Mohn y Presthus, reportaron que después del nacimiento, seis perros de raza Bóxer presentaron alteraciones neurológicas, mostrando encefalomielitis y miositis asociada a la presencia de estructuras parasitarias parecidas a *Toxoplasma gondii*, sin embargo, no se encontraron anticuerpos anti-*T. gondii* en el suero de estos perros. Dubey *et al.* en 1988, encontraron un parásito similar en 10 perros de Estados Unidos de América que presentaron una semiología parecida, distinguiéndolo de *T. gondii* y llamándolo *Neospora* como un nuevo género y *caninum* por ser el perro la primera especie en donde fue identificado. En el mismo año, aislaron a *N. caninum* de perros con infección natural y lo cultivaron en ratones. Además, en este mismo año, se desarrolló por primera vez la prueba de

Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico serológico de la enfermedad. Lindsay y Dubey (1989a), desarrollaron la prueba de inmunohistoquímica para identificar antígenos de *N. caninum* en los tejidos de animales infectados. Bjerkås y Dubey en 1991, confirmaron que el parásito encontrado en los tejidos de los perros de Noruega era también *N. caninum*. Lindsay y Dubey en 1989b y 1990, realizaron las primeras evaluaciones para el tratamiento de la neosporosis utilizando medicamentos para inhibir el crecimiento de taquizoitos cultivados en células y ratones. Björkman *et al.* (1994); Paré *et al.* (1995) y Dubey *et al.* (1996), desarrollaron el diagnóstico serológico de neosporosis a través del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en bovinos y perros, mientras que Romand *et al.* (1998) implementaron la prueba de aglutinación directa (NAT) en suero. Los primeros estudios moleculares del parásito en tejidos fueron realizados por Yamage en 1996.

5.3 Clasificación Taxonómica

Reino Protozoa, filo Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina, familia Sarcocystidae, género *Neospora*, especie *caninum* (Dubey *et al.*, 2002).

5.4 Morfología

Los taquizoítos pueden medir cerca de 6 x 2 µm, presentando una forma semi-lunar y se caracterizan por ser la fase de multiplicación rápida del parásito. Presentan todas las estructuras de los miembros del filo Apicomplexa; un complejo apical, que tiene la función de secretar enzimas de fijación y adhesión a receptores de superficie. Se pueden localizar en varias partes del organismo, como células nerviosas, macrófagos, células endoteliales vasculares entre otras; su multiplicación ocurre en células de tejidos infectados, formando una vacuola parasitófora (Goodswen *et al.*, 2013).

Los bradizoítos son la forma de multiplicación lenta del parásito, pueden medir cerca de 7 x 1.5 µm, presentando los mismos organelos encontrados en los taquizoítos. Los quistes pueden llegar a medir 107 µm de diámetro, presentando forma oval de

pared lisa que puede medir de 1 a 4 μm de espesor. En su interior podemos encontrar de 20 -100 bradizoítos; éstos se localizan principalmente en tejido nervioso de los hospederos intermediarios (Goodswen *et al.*, 2013).

Los ooquistes, los cuales son liberados en las heces de los hospederos definitivos, son esféricos, miden de 9 -11 μm de diámetro y poseen, cuando están esporulados, dos esporocistos con cuatro esporozoítos cada uno (Dubey *et al.*, 2002).

5.5 Ciclo biológico

N. caninum presenta un ciclo de vida heteroxeno, donde una gran variedad de especies se puede considerar como hospederos intermediarios, entre ellas, bovinos, ovinos, y caprinos entre otros mamíferos. Existen dos modos distintos de reproducción de *N. caninum*: reproducción sexual, que tiene lugar solamente en el huésped definitivo; y la reproducción asexual, que tiene lugar en huéspedes intermediarios (Dubey *et al.*, 2007).

Los ooquistes no esporulados se eliminan en las heces de caninos infectados. La pared del ooquiste es robusta, resistente a la congelación y secado, permite a los esporozoítos sobrevivir durante largos periodos de tiempo. Fuera del huésped los ooquistes esporulan, conteniendo dos esporocistos que contiene cada uno cuatro esporozoítos (Dubey *et al.*, 2002). Diferentes animales, como el ganado, pueden ingerir ooquistes esporulados que se encuentran en los pastizales o en agua contaminada y se infectan (Figura 1). Los esporozoítos son liberados (por exquistación) en el intestino del huésped intermediario, después de lo cual invaden la pared intestinal y se transforman en taquizoítos. Los taquizoítos, que se encuentra en compartimentos intracelulares llamados vacuolas parasitósforas, rápidamente se replican por endodiogenia (el proceso de desarrollo asexual por el cual dos células hijas se desarrollan internamente dentro de la célula madre parásito). Los taquizoítos pueden invadir e infectar diferentes tipos de células en todo el huésped incluyendo tejido nervioso, macrófagos, fibroblastos, endotelios vasculares, músculo y células

hepáticas (Dubey *et al.*, 2006). La rápida replicación de taquizoítos se limita *in vivo* a alrededor de 20 divisiones (alrededor de tres semanas de duración), antes de que se diferencien en forma de quistes en los tejidos: bradizoítos (Dubey *et al.*, 2017).

Los bradizoítos son de reproducción lenta y se forma asexualmente por endodiogenia. Los quistes tisulares se encuentran típicamente en tejido nervioso (cerebro y la médula espinal, por ejemplo), o células del músculo esquelético (Dubey *et al.*, 2007), y pueden persistir durante la vida del huésped intermediario sin causar manifestaciones clínicas significativas (Dubey *et al.*, 2017).

El ciclo de vida se completa cuando los quistes tisulares (por ejemplo, carne cruda, placentas, fetos), son ingeridos por el huésped definitivo, el perro (McAllister *et al.*, 1998). Los quistes pueden sobrevivir al paso por el estómago, pero la liberación de los bradizoítos infecta a las células epiteliales del intestino delgado. Las etapas esquizogonia y gametogonia aún no se ha observado en las células intestinales, pero estas etapas se presumen preceden a la formación de ooquistes en el intestino de los perros (Dubey y Schares, 2011); recientemente, se ha reportado el hallazgo de estados enteroepiteliales del parásito (ooquistes-like y esquizontes-like), en un cachorro con infección natural sistémica fatal (Kul *et al.*, 2015). Los ooquistes contienen esporozoitos y el ciclo de vida comienza de nuevo al eliminarse y contaminar el medio ambiente (Dubey *et al.*, 2017).

El perro, eventualmente puede actuar como huésped intermediario, si ingiere ooquistes esporulados a través de agua u otro alimento contaminado; esta ruta de infección se ha demostrado experimentalmente en cachorros (Bandini *et al.*, 2011), pero se desconoce la importancia de este mecanismo de transmisión en infecciones naturales (Dubey *et al.*, 2007; 2017).

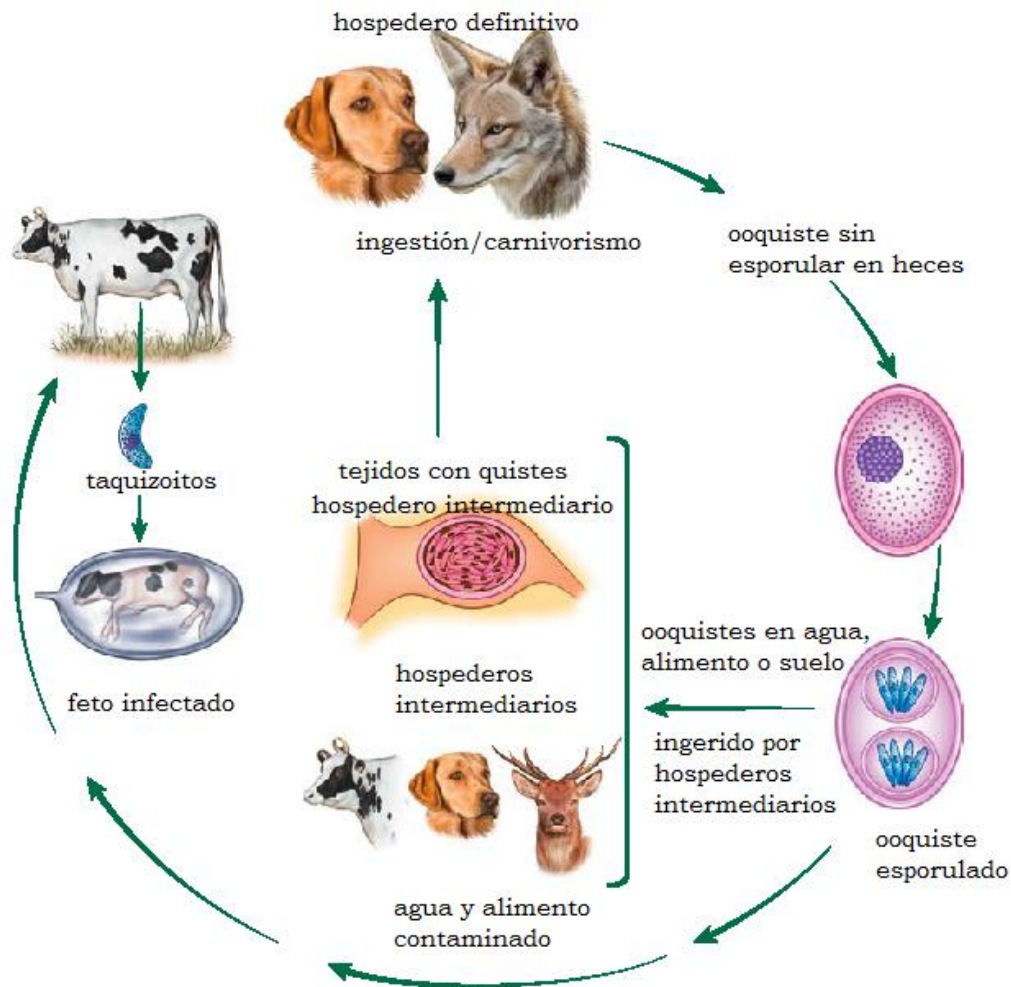


Figura 1. Ciclo biológico de *Neospora caninum* (adaptado de Dubey et al., 2017)

5.6 Neosporosis en perros

Los perros de cualquier edad pueden desarrollar neosporosis (Dubey et al., 2017), aunque la mayoría de los casos clínicos que se han reportado es en animales jóvenes entre las 2 y 20 semanas de edad, congénitamente infectados (Barber, 1998; Basso et al., 2005). Sin embargo, en los últimos años, se ha visto un número mayor de casos clínicos de perros de diferentes edades con signos nerviosos asociados a *N. caninum*, diagnosticados mediante serología, imágenes de resonancia magnética y pruebas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Didiano et al., 2020).

El curso de la enfermedad es variable, pudiendo presentarse la muerte durante la primera semana en la que se presentan los signos clínicos, hasta varias semanas después. *N. caninum* es capaz de producir necrosis e inflamación de los tejidos en pocos días debido a la multiplicación de varias generaciones de taquizoítos infectando nuevas células. Los perros jóvenes infectados congénitamente, sufren severas lesiones en el sistema nervioso, y producto de ello desarrollan paresia flácida o espástica unilateral o bilateral de los miembros pélvicos hasta parálisis progresiva. Los miembros pélvicos se afectan más severamente que los miembros torácicos y con frecuencia presentan hiperextensión rígida. También puede ocurrir disfagia, parálisis de la mandíbula, flacidez y atrofia muscular, alteración de los reflejos oculares, vómito, polidipsia e insuficiencia cardíaca y respiratoria; en perros adultos también se pueden presentar estas manifestaciones clínicas, pero son menos frecuentes y severas, y en ocasiones responden al tratamiento farmacológico aunque este debe de ser prolongado pues las recidivas son frecuentes (Barber y Tress, 1996; Dubey *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2017; Didiano *et al.*, 2020).

En la neosporosis subclínica, los bradizoítos intracelulares se rodean por su pared formando quistes, pueden persistir en el hospedero por varios años sin inducir respuesta inflamatoria (neosporosis latente), sin embargo, si un animal sufre de inmunodepresión o inmunosupresión por tratamiento con fármacos corticosteroides (Magaña *et al.*, 2015; Legnani *et al.*, 2016) puede desarrollar el cuadro clínico por reactivación o por ruptura de quistes en tejido (Dubey *et al.*, 2017).

Dubey y Lindsay en 1989 y Cole *et al.* en 1995, trabajaron para demostrar experimentalmente la infección transplacentaria, años más tarde se cotejó que en perras con neosporosis subclínica con infección natural pueden transmitir el parásito a sus fetos a través de la placenta, aunque esta puede ser variable y no todos los cachorros desarrollan la enfermedad (Barber y Trees, 1998; Reichel *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2017).

Existen escasos estudios en donde ha sido posible identificar ooquistes en perros con infección natural y aislar al parásito (Basso *et al.*, 2005; Slapeta *et al.*, 2002; McGarry *et al.*, 2003; Schares *et al.*, 2005; McInnes *et al.*, 2006; Basso *et al.*, 2009a, 2009b).

El tratamiento de la neoprosis clínica en perros se ha realizado con fármacos tales como trimetoprim-sulfadiazina combinada con pirimetamina o solo clindamicina. La velocidad de absorción de clindamicina en los perros es rápida después de la administración oral y es comparable con los índices de absorción intramuscular. La administración de trimetoprim-sulfadiazina (15 mg / kg, por vía oral [PO], cada 12 horas) con pirimetamina (1 mg / kg, PO, cada 24 horas) durante 11 semanas o clindamicina (10 mg / kg, PO, cada 8 horas) durante 4 semanas fue recomendado para el tratamiento de la neoprosis canina (Lyon, 2010; Dubey *et al.*, 2017).

5.7 Técnicas de diagnóstico de *N. caninum*

En perros, el diagnóstico clínico puede ser difícil debido a que la sintomatología neurológica que se presenta en estos animales no es consistente y debe diferenciarse de otras afecciones como el moquillo canino (Lyon, 2010). En perros jóvenes y adultos, es poco frecuente la presentación de un cuadro entérico que pueda asociarse con *N. caninum*, además la eliminación de ooquistes no es en forma constante, siendo un hallazgo realmente raro (Dubey *et al.*, 2017).

Debido a que no existen tratamientos o vacunas efectivas, el diagnóstico es esencial para el control del parásito. Los estudios de los mecanismos de patogénesis de *N. caninum* han llevado a la identificación de nuevos antígenos, incluidos NcSRS2, NcSAG1, Ncp40, NcSUB1, NcMIC10 y NcGRAS; y se ha propuesto una variedad de ensayos moleculares e inmunológicos, basados en estas moléculas, para detectar *N. caninum* en tejidos o muestras de suero, avances basados en pruebas de diagnóstico inmunológico y molecular (Sinnott *et al.*, 2017).

5.7.1 Técnicas de diagnóstico indirecto de *N. caninum*

Entre las técnicas de diagnóstico se incluyen las serológicas, como la detección de anticuerpos por Inmunofluoresencia indirecta (IFI), que consiste en visualizar la reacción antígeno-anticuerpo por medio de una anti-inmunoglobulina marcada con fluorocromos, esta técnica fue desarrollada por Dubey *et al.* (1988), y desde entonces es ampliamente utilizada como prueba de referencia para el diagnóstico de neosporosis, particularmente útil en perros, en los cuales un título mayor o igual a 1:50 indica exposición del perro con el agente (McAllister *et al.*, 1998), además muestra baja reacción cruzada con otros parásitos del género apicomplexa y puede cuantificarse titulando los sueros (Khan *et al.*, 2020).

También se ha desarrollado una prueba directa de aglutinación de *Neospora* (NAT) al reemplazar el antígeno de *T. gondii* de la prueba de aglutinación modificada con un antígeno específico de *Neospora* (Romand *et al.*, 1998). NAT se ha utilizado para evaluar la presencia de IgM; sin embargo, el método de detección serológica más extendido y comercialmente utilizado es el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), es útil para un gran número de muestras con alta especificidad. Se han establecido varios métodos ELISA, es decir, ELISA indirectos (iELISA) y ELISA celulares (cELISA) utilizando principalmente lisado de taquizoitos totales o antígenos nativos purificados para la sensibilización de la placa de poliestireno. Una desventaja de utilizar antígenos nativos o totales es la posibilidad de reactividad cruzada con otros parásitos apicomplexas estrechamente relacionados. Por lo tanto, una amplia gama de antígenos específicos de *Neospora* se utilizan actualmente para recubrir placas ELISA con el fin de establecer la especificidad, también se han establecido pruebas de avidéz basadas en ELISA que usan anticuerpos IgG, IgA e IgE para estimar el momento de la infección (Khan *et al.*, 2020).

5.7.2 Técnicas de diagnóstico directo de *N. caninum*

La Inmunohistoquímica (IHQ), y la detección de ADN del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son las principales técnicas que se incluyen en el diagnóstico directo. La inmunohistoquímica es una técnica muy

sensible y ampliamente usada para la detección de neospora en tejidos. Las técnicas de inmunoperoxidasa indirecta del complejo avidina-biotina y peroxidasa-anticuerpo son métodos igualmente sensibles. En ambas, anticuerpos monoclonales y policlonales específicos han sido utilizados para IHQ, con anticuerpos policlonales de conejo muestran más sensibilidad que los anticuerpos monoclonales. Recientemente, sin embargo, se demostró que una combinación de anticuerpos monoclonales NcSRS2 y NcGRA7 más específica y tan sensible como los anticuerpos policlonales, evitando el potencial de reactividad cruzada de anticuerpos policlonales con *T. gondii* o parásitos coccidianos relacionados (Khan *et al.*, 2020).

Los marcadores moleculares más utilizados en *Neospora* son la región 18S rRNA e ITS1 dentro de la subunidad pequeña ARN ribosomal (ssuRNA) y del gen pNc5 (número de acceso GenBank, X84238) (Sinnott *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2020). De este último, los primers Np6/Np21 propuestos por Yamage *et al.* (1996) han sido los más utilizados para la detección de ADN de *N. caninum* por PCR (Dubey *et al.*, 2017)

5.8 Epidemiología

La prevalencia de anticuerpos anti-*N.caninum* en perros de diferentes partes del mundo, se muestran en el cuadro 1, catalogando como tipo de perro, ya sea por lugar donde vive (urbanos, rurales) o algún fin zootécnico, número de animales muestreados y el porcentaje de animales positivos, la mayoría de los estudios utilizaron la prueba de IFI (Dubey y Schares, 2011; Lopes-Sicupira *et al.*, 2012; de Sousa *et al.*, 2012; Nazir *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 2015; Schüle *et al.*, 2015; Machacova *et al.*, 2016; Robbe *et al.*, 2016; Okumu *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Lima-Acosta *et al.*, 2016; Hosseininejad *et al.*, 2017; Sloan *et al.*, 2017; Snak *et al.*, 2018; Brasil *et al.*, 2018; Villagra-Blanco *et al.*, 2018; Dwinata *et al.*, 2018; Coelho *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2019; Pinto-Ferreira *et al.*, 2019).

Cuadro 1. Prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en perros.

País	Tipo Perro	No. Muestras	% positivos	Prueba	Titulo	Referencia
Argelia						
	Perrera	261	22.5	IFI	NS	Ghalmi <i>et al.</i> (2009)
	Guardia	85	6.6			
	Criadero	184	12			
	Granja	80	44.4			
Brasil						
Goiás	Urbanos	197	32.9	IFI	1:50	Boaventura <i>et al.</i> (2008)
Mato Grosso	Clínicas	60	45.0	IFI	1:50	Benetti <i>et al.</i> (2008)
	Granja lecheras	37	67.6	IFI	1:200	
Minas Gerais	Clínicas	228	3.1	IFI	1:50	Benetti <i>et al.</i> (2009)
Pará	Rurales	72	11.1	IFI	1:50	Guimaraes <i>et al.</i> (2009)
	Urbanos-callejero	57	14			
Paraná	Urbanos	181	12.7	IFI	1:50	Valadas <i>et al.</i> (2010)
	Periurbanos	178	15.7			
	Rurales	197	25.3	IFI	1:50	
	Granja	163	11.6			
	Urbanos	649	1.4	IFI	1:50	Snak <i>et al.</i> (2018)
Rio Grande do Sul	Rurales	230	20.4	IFI	1:50	Pinto-Ferreira <i>et al.</i> (2019)
	Urbanos	109	5.5			
Sao Paulo	Urbanos	108	15.7	IFI	1:50	Cunha Filho <i>et al.</i> (2008)
	Urbanos	963	25.8	IFI	1:50	
	Rurales		16.9			
	Periurbanos		33.3			
Bahía	Urbanos	156	2.6	IFI	1:50	Lopes-Sicupira <i>et al.</i> (2012)
	Periurbanos	28	13.1			
	Rurales	41	14.6			
Alagoas	Rurales	237	4.8	IFI	1:50	de Sousa <i>et al.</i> (2012)
	Urbanos		3.8			
Tocantis	Rurales	204	31.3	IFI	1:25	Macedo <i>et al.</i> (2015)
	Urbanos		29.5			

Espirito Santo	Rurales	187	11.7	IFI	1:50	Lima-Acosta <i>et al.</i> (2016)
Paraíba	Clínicas	384	1.6	IFI	1:50	Brasil <i>et al.</i> (2018)
Pernambuco	Domiciliados	241	24.06	IFI	1:50	Souza <i>et al.</i> (2019)
Canadá						
Territorio Noroeste	Clínicas	108	3.7	IFI	1:25	Salb <i>et al.</i> (2008)
India						
Oeste India		107	2	IFI	1:100	Dubey <i>et al.</i> (2008)
Irán						
	Granja	50	28	IFI	1:50	Haddadzadeh <i>et al.</i> (2007)
	Urbanos	50	11.3			
	Granjas lecheras	113	20	IFI	1:16	Hosseininejad <i>et al.</i> (2017)
México						
Aguascalientes	Urbanos	116	20	ELISA		Cruz-Vázquez <i>et al.</i> (2008)
	Granjas lecheras	152	40.7			
Durango	Pound	101	2	IFI	1:25	Dubey <i>et al.</i> (2007)
Hidalgo	Granjas Lecheras	27	51	ELISA		Sánchez <i>et al.</i> , (2003)
	Urbanos	30	20			
Perú						
	Granja	122	14.8	IFI	1:50	Vega <i>et al.</i> (2010)
Polonia						
	Clínicas	110	16.3	IFI	1:50	Ploneczka and Mazurkiewicz (2008)
España						
Galicia	Granja	141	47.5	IFI	1:50	Regidor-Cerrillo <i>et al.</i> (2010)
	Callejeros	134	39.5	IFI	1:50	

Varias áreas	Casa	102	2.9	IFI	1:50	Collantes-Fernandez <i>et al.</i> (2008)
	Callejeros	94	24.5			
	Cacería	100	23			
	Granja	100	51			
Turquía						
Kirikkale	Callejeros	121	28.9	IFI	1:16	Yildiz <i>et al.</i> (2009)
Pakistán						
Punjab	Granjas	138	36.9	ELISA		Nazir <i>et al.</i> (2014)
	Lecheras					
	Mascota sin signos nerviosos	294	10.5			
	Mascota con signos nervioss	76	28.9			
Albania	Callejeros	92	40.2			
	Policia	119	12			
Italia						
Campania	Cacería	398	15	IFI	1:50	Machacova <i>et al.</i> (2016)
Abruzzo	Granja Criadero	100	32	IFI	1:50	Robbe <i>et al.</i> (2016)
Kenia						
Distrito Nakuru	Granja	84	17.9	ELISA		Okumu <i>et al.</i> (2016)
China						
Provincia Henan	Domésticos	1176	15	IFI	1:50	Wang <i>et al.</i> (2016)
Noreste	Rural	476	20	IFI	1:50	Gao <i>et al.</i> (2019)
Australia						
Victoria	Domésticos	483	29.8	ELISA /IFI	1:50	Sloan <i>et al.</i> (2017)
Alemania						
	Clínica	218	7.33	ELISA		Villagra-Blanco <i>et al.</i> (2018)
Indonesia						
Bali	Granja	147	3.4	ELISA		Dwinata <i>et al.</i> (2018)

Reino Unido						
	Clínica	201	6.96	IFI	1:50	Coelho <i>et al.</i> (2018)

NS, no se indica

IFI: Técnica de Inmunofluorescencia indirecta

ELISA: Ensayo Inmunoasorbente ligado a enzimas

A pesar que la seroprevalencia a la infección por *N. caninum* en perros es relativamente alta como se muestra en el cuadro 1, y Anvari *et al.* (2020) realizan una revisión sistemática y un meta-análisis para evaluar la tasa de seroprevalencia mundial de *N. caninum* en perros, donde concluyen que los perros son motivo de preocupación para los funcionarios de salud pública como fuente de infección por *N. caninum*, a pesar de ello, existen pocos reportes de eliminación de ooquistes de *N. caninum* en perros con infección natural, la prevalencia de la excreción en heces de perros es de 0.03 al 4.9% (Perrucci *et al.*, 2017). Algunos de los trabajos que se han realizado se muestran en el cuadro 2 (McGarry *et al.*, 2003; Schares *et al.*, 2005; Palavicini *et al.*, 2007; Paradies *et al.*, 2007; Razmi, 2009; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010; Mitrea *et al.*, 2013; Asmare *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Qian *et al.*, 2016; Sloan *et al.*, 2017).

Cuadro 2. Prevalencia de ooquistes-like de *N. caninum* en heces de perro.

País	No. Perros	Origen	No. Positivos	Microscopía	Nc-PCR	Referencia
Reino Unido	15	Perrera	2	2	1	McGarry <i>et al.</i> (2003)
Alemania	24089	Desconocido	47	47	0	Schares <i>et al.</i> (2005)
Costa Rica	34	Establo	3	0	3	Palavicini <i>et al.</i> (2007)
Italia	230	Establo	0	0	No se realizó	Paradies <i>et al.</i> (2007)
Irán	174	89 Establo, 85 Casa	4	4	2	Razmi (2009)
España	285	Establo	1	1	No se realizó	Regidor-Cerrillo <i>et al.</i> (2010)
Rumania	386	41 Rural, 118 Establo, 192 Callejeros	19	4 6	No se realizó	Mitrea <i>et al.</i> (2013)

Etiopia	218	Casa	24	9	No se realizó	Asmare <i>et al.</i> (2014)
	165	Establo	13	13 4		
China	212	Establo y perros policía	74	0	74	Li <i>et al.</i> (2014)
		Establo	7	2	7	Qian <i>et al.</i> (2016)
Australia	234	35 Domestico,	2	2	0	Sloan <i>et al.</i> (2017)
		11 Salvajes,	1	1	0	
		188 Zorro rojo	15	15	0	

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar de estudio

Con la finalidad de llevar a efecto el trabajo de campo para la colecta de muestras y recolección de información, el proyecto se desarrolló en dos etapas.

La primera etapa se verificó en Unidades de Producción Lechera (UPL) del estado de Aguascalientes, el cual se encuentra localizado en la región centro-norte de México, a una altura sobre el nivel del mar entre 1860 y 2010 m, con temperatura promedio anual de 18°C, con clima semiseco árido y extremoso con régimen de lluvias en verano.

La segunda etapa se realizó en el municipio capital del estado de Aguascalientes, con apoyo del Centro de Control, Atención y Bienestar Animal (CCABA), dependencia del municipio de Aguascalientes.

El trabajo de laboratorio y de gabinete, se realizó en el Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, localizado en el Km. 18 de la carretera Aguascalientes – San Luis Potosí, en el municipio de El Llano, Aguascalientes.

6.2 Desarrollo del estudio

6.2.1 Primera etapa.

En esta etapa se desarrolló el estudio que permitió documentar el primer y segundo objetivo del presente trabajo.

6.2.1.1 Selección de los animales

Se incluyeron en el estudio ocho UPL seleccionadas mediante el método no probabilística de conveniencia (Thrusfield, 2018); los criterios de inclusión fueron: a) que en la explotación existieran perros que convivieran estrechamente con el ganado bovino, y b) que el propietario permitiera el muestreo y accediera a contestar una encuesta. Una vez que los propietarios accedieron a participar en el estudio se realizó un diagnóstico serológico en 10% del ganado lechero presente en cada UPL, con la finalidad de estimar la prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en la UPL. Se incluyeron en el estudio 24 perros, correspondiendo a 3 perros en cada una de las UPL, no importando sexo, edad ni alguna otra característica.

6.2.1.2 Toma de muestras

Sangre de ganado bovino

Al ganado se le colectó una muestra de sangre por punción de la vena coccígea con aguja y tubo vacutainer nuevo sin anticoagulante. Las muestras fueron debidamente identificadas y trasladadas al laboratorio en condiciones de refrigeración. En el laboratorio se obtuvo el suero por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min., y se colocó en microtubos de 1.5 ml para su almacenamiento a -40°C, hasta su uso en la prueba de ELISA.

Sangre de los perros

Se asistió a las UPL una vez por mes, a partir del mes de febrero hasta el mes de julio del 2017, en cada visita se tomó de cada perro una muestra de sangre por punción de la vena cefálica con aguja de 21Gx ½" la cual fue depositada en tubos vacutainer nuevos, uno sin anticoagulante, para obtener el suero sanguíneo, y otro con anticoagulante (EDTA). Las muestras fueron debidamente identificadas y trasladadas al laboratorio en condiciones de refrigeración. En el laboratorio se obtuvo el suero por centrifugación a 10,000 rpm por 10 min., y se colocó en microtubos de 1.5 ml para su almacenamiento a -40°C, hasta su uso en la técnica de IFI; la muestra de sangre periférica también fue almacenada a -40°C, hasta su uso en la prueba de PCR.

6.2.1.3 Recopilación de información

Se levantó una cédula censal de todas las UPL para contar con información básica de identificación de las mismas, así como de sus prácticas de manejo zootécnico (Anexo 1). Además, a cada uno de los perros que se incluyeron en el estudio, se les elaboró una cédula de identificación conteniendo información sobre su edad (evaluada por revisión de la dentición), sexo, raza, alimentación, y hábitos de comportamiento, presencia de otras especies de animales domésticos; también se practicó una revisión física para evaluar el estado de salud de cada sujeto (Anexo 2).

6.2.1.4 Serodiagnóstico

Ganado bovino

Las muestras de suero de los bovinos fueron procesadas mediante la prueba serológica de ELISA indirecta con el paquete comercial *Neospora caninum* Antibody Test kit (IDEXX Neospora X2, IDEXX Laboratories Inc), con sensibilidad de 98.6% y especificidad de 98.8% de acuerdo con el fabricante, siguiendo el procedimiento recomendado por el mismo. La prueba se realizó con una sola dilución 1:100, que identifica positivos y negativos a la absorbancia de 450 nm, utilizando el software CHEKIT-NEO provisto por el mismo fabricante que considero como positivas aquellas muestras con una absorbancia ≥ 0.5 .

Perros

Las muestras de suero de los perros fueron procesadas mediante la prueba serológica de IFI, para tal fin, se utilizaron laminillas sensibilizadas con taquizoitos de la cepa Nc-1 (VDRM, Inc., Pullman, Washington), realizando el siguiente protocolo: los sueros fueron diluidos (1:50) en buffer fosfatos (PBS) pH 7.2 y se utilizó un conjugado anti-IgG de perro marcado con fluoresceína, utilizando controles positivos y negativos en cada laminilla (VDRM, Inc., Pullman, Washington); se consideró una muestra como positiva a la dilución $\geq 1:50$ debiendo observarse la fluorescencia completa en todo el contorno del parásito, posteriormente se titularon las muestras

positivas hasta la última dilución del suero en la cual se observó fluorescencia; todas las muestras se trabajaron por duplicado (Dubey *et al.*, 1988; Collantes-Fernández *et al.*, 2008).

6.2.1.5 Detección de ADN de *N. caninum* en sangre periférica

Las muestras de sangre con EDTA, fueron procesadas para extraer ADN genómico con el paquete comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), y posteriormente se sometieron a la prueba de PCR siguiendo la metodología descrita por Yamage *et al.* (1996), con los iniciadores Np21/Np6 (5'GTGCGTCCAATCCTGTAAC-3' - 5'CAGTCAACCTACGTCTTCT3') esperando un amplicon 328 bp. El producto de la PCR, además de un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen Inc., Carlsbad, California), un control positivo y otro negativo (Medina *et al.*, 2006), fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% con Bromuro de etidio para observar bandas en un transiluminador UV de 328 pb de la amplificación de las regiones ITS-1 de *N. caninum*.

6.2.1.6 Análisis de la información

Se calculó la seroprevalencia de anticuerpos *anti-N.caninum* de manera mensual, así como la incidencia de la infección en la población bajo estudio; se registró la evolución de los títulos de anticuerpos *anti-N. caninum* en los perros seropositivos. Se estimó la prevalencia de la infección en cada una de las variables y categorías de los hipotéticos factores de riesgo considerados en el estudio a partir de la información recabada en la encuesta aplicada a los propietarios de los perros. Para establecer el riesgo de la infección por *N. caninum* se realizó un análisis de regresión logística (Hosmer *et al.*, 2013) en donde la variable dependiente fue la seropositividad de *N. caninum* y las independientes fueron las obtenidas de la encuesta levantada con los propietarios (Anexo 2): edad (confirmada por revisión de la dentición), género (macho/hembra), raza (pura/mezclada), acceso a placentas y tejidos fetales, hábitos de comportamiento (deambula o no libremente en la UPL), y la presencia de otras especies de animales domésticos en la UPL. La selección de

las variables independientes se llevó a cabo por el método *backward step by step*; por ello, según la estadística en la prueba de χ^2 , se excluyeron las variables no significativas ($p < 0.05$). Los Odds Ratio (OR), se estimaron para las variables independientes que resultaron estadísticamente significativas en el análisis multivariado ($p < 0.05$). En análisis se desarrolló con el programa Statistics and Data Science (STATA) v. 10.1 software (StataCorp, 2009).

6.2.2 Segunda etapa.

En esta etapa se desarrolló el estudio que permitió documentar el tercer, cuarto y quinto objetivo del presente trabajo.

6.2.2.1 Selección de Animales

Se realizaron las gestiones pertinentes en el CCABA, para que brindarían facilidades para la toma de muestras de tejido encefálico, sangre y heces de perros destinados al sacrificio humanitario, de los cuales el CCABA toma muestras para el monitoreo de la frecuencia del virus de la rabia urbana de forma periódica; de esta manera, se tuvo acceso a los animales para la toma de muestras sin realizar un manejo exclusivo para el estudio; sólo se incluyeron en el estudio perros que provinieran de la periferia de la ciudad capital (áreas suburbanas), o de comunidades rurales dentro del municipio de Aguascalientes. La búsqueda de perros que reunieran estas características se realizó durante 6 meses.

6.2.2.2 Toma de muestras

En los perros seleccionados para el estudio, antes del sacrificio, se tomó una muestra de sangre por punción de la vena cefálica con aguja de 21Gx ½" la cual fue depositada en tubos vacutainer nuevos, uno sin anticoagulante, para obtener el suero sanguíneo. Las muestras fueron debidamente identificadas y trasladadas al laboratorio en condiciones de refrigeración. En el laboratorio se obtuvo el suero por

centrifugación a 10,000 rpm por 10 min., y se colocó en microtubos de 1.5 ml para su almacenamiento a -40°C, hasta su uso en la técnica de IFI.

Posterior a esta actividad, el personal del CCABA realizó el sacrificio del sujeto de acuerdo a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, y se procedió a la toma de muestra de encéfalo de la siguiente forma: se colocó la cabeza del individuo en una superficie aséptica y se procedió a retirar la piel del cráneo y cortar los huesos con segueta, el primer corte de hueso fue transversal y posterior a las cuencas oculares, después se realizaron dos cortes, uno en cada hueso parietal, tomando como referencia la comisura externa del ojo y la porción lateral del agujero magno exactamente encima de los cóndilos del occipital, evitando cortar la masa encefálica; al desprender la bóveda craneana quedó descubierto el encéfalo. Se cortaron con tijeras las meninges y se extrajo cuidadosamente la masa encefálica. Se procedió a tomar la muestra de tejido encefálico (cerebro y cerebelo), de dimensiones de 1 a 1.5 cm³, colocando una porción en un envase nuevo que contenía formalina neutra bufferada al 10%; el volumen debe ser 10 veces el volumen del tejido para la fijación por inmersión y conservación hasta su procesamiento en el laboratorio (Experimental Pathology Research Laboratory, 2016); otra porción de dimensiones similares se colocó en una bolsa de plástico nueva con cierre hermético para transportarla al laboratorio en condiciones de refrigeración para su congelación a - 40°C hasta su uso.

La toma de muestra de heces se realizó directamente del recto de cada uno de los perros, colocándolas en bolsas de plástico nuevas, se identificaron y se transportaron al laboratorio a una temperatura de 4°C, en donde se conservaron en refrigeración hasta procesarse (no más de 24 h posteriores a la toma).

De cada uno de estos perros se registraron datos de identificación, tales como, raza o biotipo, edad (verificada por revisión de la dentición), sexo, procedencia (localidad/colonia), y motivo de ingreso al CCABA (Anexo 3).

6.2.2.3 Detección de ADN de *N. caninum* en tejido

Para esta actividad, la extracción de ADN se realizó utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), una vez obtenido el ADN se sometió a la prueba de PCR siguiendo la metodología descrita por Yamage *et al.* (1996) con los iniciadores Np21/Np6 (5'GTGCGTCCAATCCTGTAAC-3' - 5'CAGTCAACCTACGTCTTCT3') esperando un amplicon 328 bp. El producto de la PCR, además de un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen Inc., Carlsbad, California), un control positivo y otro negativo (Medina *et al.*, 2006), fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% con Bromuro de etidio para observar bandas en un transiluminador UV de 328 pb de la amplificación de las regiones ITS-1 de *N. caninum*.

6.2.2.4 Detección de lesiones y/o quistes de *N. caninum* en tejido

El tejido conservado en formalina neutra al 10% por 48 h, se procesó para Histopatología convencional embebiéndolo en parafina; se cortaron cinco secciones de 3 µm cada una, separadas por 50 µm entre cada uno. Los cortes histológicos fueron teñidos con Hematoxilina – Eosina (HE), y fueron analizados bajo el microscopio a 40 y 100x para observar lesiones sugestivas y/o quistes del parásito (Morales *et al.*, 2001; Pescador *et al.*, 2007).

6.2.2.5 Detección de anticuerpos anti-*N. caninum*

Las muestras de suero de los perros fueron procesadas mediante la prueba serológica de IFI, para tal fin, se utilizaron laminillas sensibilizadas con taquizoitos de la cepa Nc-1 (VDRM, Inc., Pullman, Washington), realizando el siguiente protocolo: los sueros fueron diluidos (1:50) en buffer fosfatos (PBS) pH 7.2 y se utilizó un conjugado anti-IgG de perro marcado con fluoresceína, utilizando controles positivos y negativos en cada laminilla (VDRM, Inc., Pullman, Washington); se consideró una muestra como positiva a la dilución $\geq 1:50$ debiendo observarse la fluorescencia completa en todo el contorno del parásito; todas las muestras se trabajaron por duplicado (Dubey *et al.*, 1988; Collantes-Fernández *et al.*, 2008).

6.2.2.6 Coprología y detección de ADN de *N. caninum* en heces

Las muestras de heces se procesaron mediante un examen coproparasitológico (CPS) utilizando la técnica de Flotación con Solución Salina Saturada (Thienpont *et al.*, 1979; Hendrix, 2006). El material que flotó fue transferido con una pipeta / gotero a un portaobjetos y cubierto con un cubreobjetos; se observó al microscopio con los objetivos 10 y 40X, para detectar ooquistes entre los 11 a 14 μm , que de acuerdo a la literatura pueden ser considerados como ooquistes-like de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 2017).

Posteriormente, las muestras se procesaron para extraer ADN mediante el paquete comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), finalmente se sometieron a la prueba de PCR siguiendo la metodología descrita por Yamage *et al.* (1996) con los iniciadores Np21/Np6 (5'GTGCGTCCAATCCTGTAAC-3' - 5'CAGTCAACCTACGTCTTCT3') esperando un amplicon 328 bp. El producto de la PCR, además de un marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, Invitrogen Inc., Carlsbad, California), un control positivo y otro negativo (Medina *et al.*, 2006), fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% con Bromuro de etidio para observar bandas en un transiluminador UV de 328 pb de la amplificación de las regiones ITS-1 de *N. caninum*.

6.2.2.7 Análisis de la información

La información generada en este trabajo, se manejó de la siguiente forma: En el caso de la detección de lesiones sugestivas en tejido encefálico, se reportaron los hallazgos obtenidos. En cuanto a la detección de anticuerpos anti-*N. caninum*, se calculó la seroprevalencia y se describieron los atributos de la población. Finalmente, los resultados obtenidos en el examen coproparasitológico se analizaron para calcular la frecuencia de ooquistes-like de *N. caninum*, así como la frecuencia de la detección de ADN de *N. caninum* en muestras fecales.

6.2.2.8. Coyote (*Canis latrans*)

En el transcurso de esta etapa, fue posible recuperar el cadáver de un Coyote (*Canis latrans*), que aparentemente había muerto por atropellamiento en las cercanías del ITEL. Al cadáver se le realizó de inmediato la necropsia, tomando una muestra de sangre por punción cardíaca que fue colocada en un tubo vacutainer nuevo con anticoagulante (EDTA), y otra parte en un tubo sin anticoagulante. Además, se tomaron muestras de cerebro, cerebelo, corazón e hígado, y por último se tomó una muestra de heces.

Estas muestras fueron conservadas y procesadas de la misma forma en que se realizó con las muestras de los perros incluidos en esta etapa del trabajo, es decir, se trabajaron para su examen serológico, coprológico y molecular.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Primera etapa: Seroprevalencia e Incidencia de anticuerpos anti-*N. caninum*, detección de ADN del parásito en sangre periférica y factores de riesgo a la infección.

La prevalencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en el primer muestreo fue de 54% (13/24; 95% I.C. 33-73) y en el último de 62% (15/24; 95% I.C. 40-80); la incidencia de la infección por *N. caninum* fue de 8.69% con dos nuevos casos positivos. En uno de las ocho UPL los perros fueron negativos a la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum*, en el resto de las UPL la seroprevalencia en la población de perros se encontró entre 66% y 100% (Cuadro 3). Los títulos de anticuerpos fueron de 1:50 hasta 1:800, un perro registró títulos de anticuerpos de 1:800 en los seis muestreos, 8 alcanzaron títulos entre 1:100 y 1:200; en los nuevos casos, los títulos fueron entre 1:50 y 1:100 (Cuadro 3).

Todos los perros permanecieron clínicamente sanos durante el periodo de estudio. La prevalencia para cada categoría de las diferentes variables consideradas en la encuesta aplicada a los propietarios se muestra en el cuadro 4.

La edad, perros > 6 años se identificó como factor de riesgo a la infección por *N. caninum* (OR=36; 95% IC 1.77-731.56, $p < 0.020$), en ninguna otra variable fue posible identificar una asociación estadísticamente significativa.

En ninguno de los seis muestreos practicados a los perros fue posible detectar la presencia de ADN del parásito en sangre.

Cuadro 3. Prevalencia y títulos de anticuerpos anti-*N.caninum* en la población bajo estudio.

Establo	Perro	Muestreo					
		1	2	3	4	5	6
1	1	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
	2	1:100	1:100	1:200	1:200	1:200	1:200
	3	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
2	1	1:200	1:200	1:200	1:200	1:400	1:400
	2	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
	3	-*	1:50	1:100	1:100	1:100	1:100
3	1	1:100	1:400	1:200	1:200	1:100	1:100
	2	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200	1:200
	3	-	-	-	-	-	-
4	1	1:800	1:800	1:800	1:400	1:400	1:800
	2	1:100	1:100	1:200	1:200	1:200	1:400
	3	-	-	-	-	-	-
5	1	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
	2	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
	3	-	-	-	-	-	-
6	1	-	-	1:100	1:100	1:100	1:50
	2	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50	1:50
	3	-	-	-	-	-	-
7	1	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
8	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
Prevalencia %		54	58	62	62	62	62

-* negativo

Cuadro 4. Seroprevalencia de la infección por *N. caninum* para las diferentes categorías en cada variable bajo estudio.

Variable	Categoría	n	Positivo <i>N. caninum</i>	Prevalencia (%)	Intervalo de confianza (95%)
Edad	<2 años	5	1	20	1-70
	2-6 años	9	5	55	22-84
	>6 años	10	9	90	54-99
Sexo	hembra	9	5	55	22-84
	macho	15	10	66	38-87
Raza	raza pura	7	5	71	30-94
	mestizo	17	10	59	33-80
Acceso a placentas, fetos	si	15	15	100	74-100
	no	9	0	0	0-37
Deambulan libremente	si	19	15	79	54-93
	no	5	0	0	
Presencia de otra especies animales en la UPL	si	12	9	75	42-93
	no	12	6	50	22-77

La prevalencia general de anticuerpos anti-*N. caninum* en el ganado lechero fue de 54.8% (51/93; IC 95% 44-65), con un rango entre unidades de producción de 22-100%; en todas las unidades se identificaron vacas seropositivas.

La neosporosis bovina es endémica en el estado de Aguascalientes, en donde la seroprevalencia se encuentra en un rango de 30 a 69% (Gutiérrez *et al.*, 2007; Medina-Esparza *et al.*, 2018), mientras que en perros de establo es de 40% (Cruz-Vázquez *et al.*, 2008). En el presente estudio, la seroprevalencia en los perros fue de

54%, lo que indica una amplia presencia del parásito y que es correspondiente a la seroprevalencia en el ganado bovino de los ranchos donde habitan los perros (54.8%), y de la región. En Brasil, la seroprevalencia en perros de establo se ha reportado entre 21.6 y 67.6% (Souza *et al.*, 2002; Benetti *et al.*, 2009), mientras que, en España, se encuentra entre 47.5 y 51% (Collantes-Fernández *et al.*, 2008; Regidor-Cerrillo *et al.*, 2010).

En cuanto a la incidencia, ésta fue de 8.69%, y los títulos de los animales seropositivos fue estable en el 69% de los casos, mientras que en el 23% tuvo una tendencia al alza, de 1:100 a 1:400, y en un caso hubo títulos fluctuantes (8%); solamente una perra de 10 años de edad presentó un título de 1:800. En otros estudios se ha observado que los títulos de anticuerpos no sobrepasan 1:800 en perros con infección subclínica (Souza *et al.*, 2002; Václavík *et al.*, 2007); sin embargo, recientemente se han reportado casos de perros que con ese título presentan manifestaciones clínicas (Didiano *et al.*, 2020). En el transcurso del seguimiento serológico se identificaron dos casos nuevos, el primero fue el de un perro de 2.5 años de edad que se identificó en el segundo mes de seguimiento con título de 1:50, que incrementó el título a 1:100 en los siguientes meses (3º a 6º); el segundo caso fue un perro de 3 años de edad que había sido recientemente introducido en la UPL y que fue identificado como positivo en el 3er mes de seguimiento con un título de 1:100 que se mantuvo por dos meses y descendió a 1:50 en la última muestra, estos hechos sugieren que los perros están expuestos al parásito adquiriendo una nueva infección o re-infectándose. Dubey y Shares (2011), mencionan que la principal ruta de infección en los perros es a través de carnivorismo, y experimentalmente se ha demostrado que el consumo de tejidos con quistes promueve la aparición de anticuerpos detectables (Cedillo *et al.*, 2008; Bandini *et al.*, 2011). Esta situación sugiere que *N. caninum* mantiene su ciclo vital utilizando al perro para promover la transmisión al ganado, así como a otros huéspedes intermediarios. El consumo de animales silvestres infectados con el

parásito, como por ejemplo ratones, ardillas y ratas pueden también contribuir al mantenimiento de la infección en el huésped definitivo (Medina-Esparza *et al.*, 2013).

Por otra parte, no fue posible detectar la presencia de ADN de *N. caninum* en las muestras de sangre periférica posiblemente porque los animales no se encontraban en una fase aguda de la infección; si se encontraban con una infección latente, la literatura menciona que la frecuencia de ruptura de quistes tisulares es desconocida (Dubey *et al.*, 2017), sin embargo, encontrar ADN en sangre es difícil. King *et al.* (2010) realizaron infecciones experimentales en cachorros de Dingo Australiano, detectando ADN del parásito durante la fase aguda de la infección en 1 de 3 animales que inicialmente era seronegativo; el mismo autor también detectó ADN en sangre en 3 de 374 perros originarios de comunidades nativas y perros salvajes de Australia, pero solo le fue posible detectar ADN y anticuerpos simultáneamente en un perro de éstos (King *et al.*, 2012).

En la población bajo estudio en el presente trabajo, la edad (> 6 años) fue identificada como factor de riesgo para contraer la infección por *N. caninum*. En la literatura se ha reportado que la seroprevalencia se incrementa con la edad, posiblemente debido a que se tienen varios contactos con el agente a lo largo del tiempo (Souza *et al.*, 2002; Cruz-Vázquez *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2016; Sloan *et al.*, 2017). Otros posibles factores de riesgo considerados en el estudio no resultaron estadísticamente significativos, sin embargo, ello no limita que sean factores que puedan favorecer la transmisión, como por ejemplo el acceso a placentas y tejidos fetales y la presencia de otras especies de animales en la UPL (Dubey *et al.*, 2017).

Estos resultados muestran que la infección por *N. caninum* se encuentra activa en las diferentes UPL de Aguascalientes y que el parásito está en capacidad de infectar y re-infectar a los perros mediante el mecanismo de transmisión horizontal, lo cual seguramente ayuda a mantener el ciclo de vida del parásito en el ambiente.

7.2 Segunda etapa: Detección de lesiones y/o quistes, así como de ADN de *N. caninum* en tejidos; examen coprológico y ADN del parásito en heces.

Se obtuvieron muestras de 24 perros, en todos los casos, el motivo de ingreso al CCABA fue registrado administrativamente como de perros despreciados, esto es, ingresan al CCABA por entrega voluntaria del propietario, quien se deshace de los perros por motivos no manifestados; nueve perros provenían de áreas suburbanas (Pocitos, Los Caños, San José de la Ordeña, Granjas Fátima) y 15 de comunidades rurales (San Antonio de Peñuelas, Cañada Honda, Bajío de SJ, Tanque de los Jiménez, Refugio de Peñuelas).

Se realizó la técnica de PCR por duplicado en las muestras de cerebro y cerebelo de cada uno de los individuos incluidos en el estudio, sin embargo, en ninguna de las muestras amplificó el fragmento deseado; en la figura 2, como ejemplo, se muestra un gel de agarosa al 2.5% con la resolución de algunas muestras clínicas, en donde solo se puede observar la banda de amplificación del control positivo (328 pb), y el marcador de peso molecular; las muestras fueron negativas.

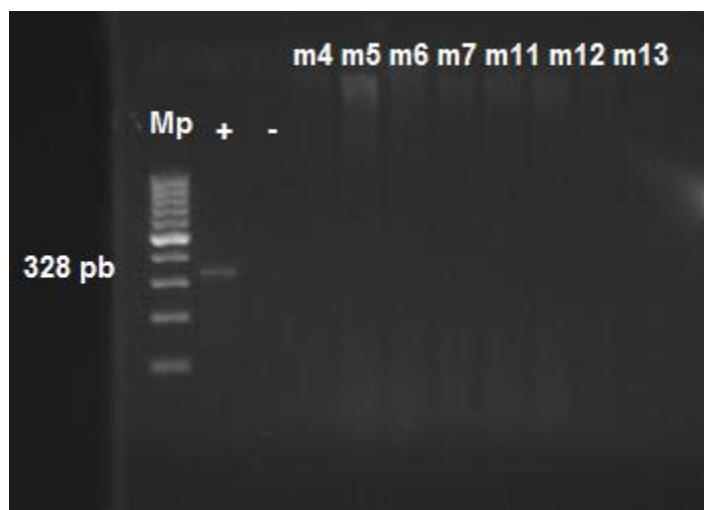


Figura 2. Gel de agarosa al 2.5% con los productos de amplificación de la PCR con los iniciadores Np21/Np6 para *N. caninum*. En la línea 1, marcador de peso molecular de 100 pb; línea 2, control positivo (328 pb); línea 3, control negativo; línea 4-10 muestras de cerebro de perro.

El estudio de los cortes histológicos de las diferentes muestras teñidas con HE, no revelaron ninguna lesión sugestiva a una infección causada por *N. caninum*, así como tampoco la presencia de alguna estructura sugestiva a un quiste de taquizoitos o bradizoitos. En las figuras 3-4 se muestran cortes histológicos obtenidos de los perros bajo estudio.

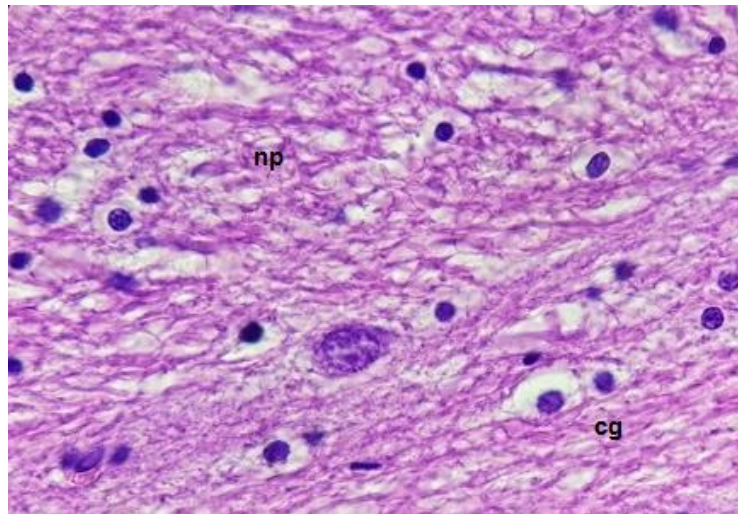


Figura 3. Corte histológico de médula (sustancia blanca) de cerebro de perro (HE), sin anomalías. La microfotografía muestra pequeños núcleos redondeados (cg) pertenecen a las células de la glía, el neurópilo (np) es esencialmente un conjunto de fibras nerviosas y células gliales.

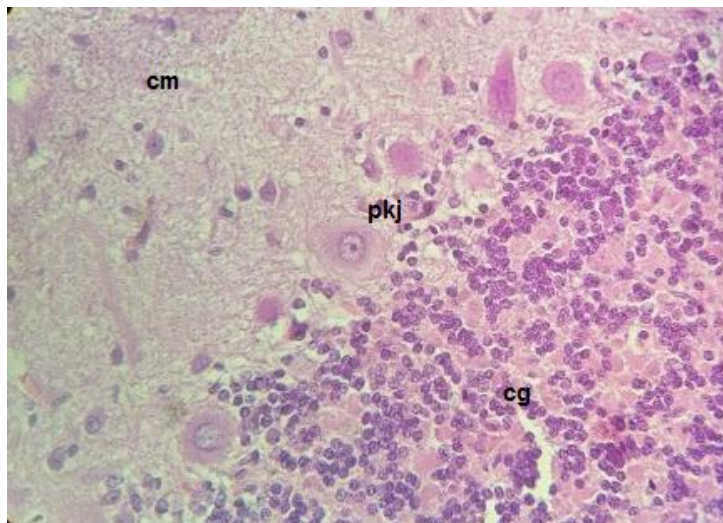


Figura 4. Corte histológico de la corteza de cerebelo de perro (HE), sin anomalías. En límite entre las capas celulares molecular (cm) y granulosa (cg) se encuentran los somas muy grandes de las células de Purkinje (pkj) que tienen forma de matraz. Estas células son características del cerebelo.

La seroprevalencia general de anticuerpos anti-*N.caninum* en los perros incluidos en el estudio fue de 54% (13/24; 95% I.C. 35-72), en los machos fue de 46% (6/13; 95% I.C. 23-70), mientras que en las hembras de 53% (7/13; 95% I.C. 29-76). La seroprevalencia en perros menores de dos años fue de 7% (1/13), entre 2 y 6 años 61% (8/13) y en perros mayores de 6 años 30% (4/13).

En cuanto al resultado de examen coprológico, la frecuencia en la detección de ooquistes-like de *N. caninum* fue en solo 2 muestras (Figura 5), y se contabilizaron de 2-4 ooquistes-like por campo, obteniendo una frecuencia de 8% (2/24; 95% I.C. 2-25); cabe señalar que estos dos casos fueron seropositivos; mientras que en la técnica de PCR ninguna de las muestras de heces amplificó el fragmento deseado.

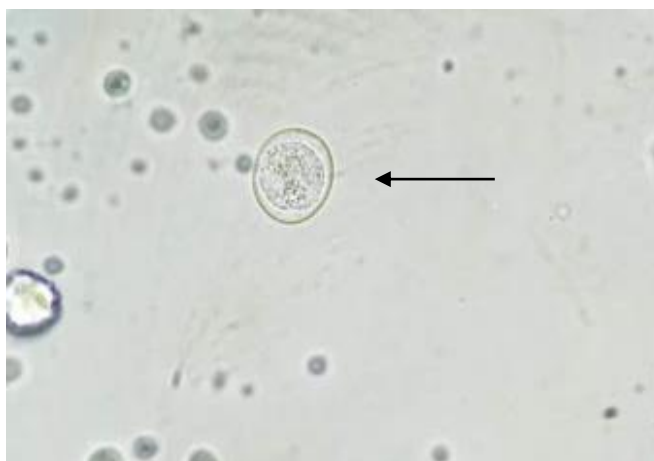


Figura 5. Ooquiste-like de *N. caninum* en flotación con solución salina saturada (100x).

Los resultados obtenidos en los 24 perros en las diferentes muestras analizadas por diferentes técnicas, se muestran en el cuadro 5, además de sus características y lugar de procedencia.

Cuadro 5. Resultados de los diferentes estudios diagnósticos en la muestra de perros incluidos en la segunda etapa del estudio.

#	Perro				Heces		Suero	Cerebro	Cerebelo	Quistes cerebro
	Sexo	Edad	Raza	Procedencia	CPS	PCR	IFI	PCR	PCR	HP
1	M	5 meses	Pastor	San Antonio de Peñuelas	-	-	-	-	-	-
2	H	5 meses	Pastor	San Antonio de Peñuelas	-	-	-	-	-	-
3	M	4 años	Pastor	San Antonio de Peñuelas	-	-	-	-	-	-
4	M	8 años	Rottwei	La Loma	-	-	+	-	-	-
5	H	11años	Rottwei	Granjas Fátima	-	-	+	-	-	-
6	H	4 años	Galgo	Cañada Honda	-	-	+	-	-	-
7	M	2 años	Sn Ber	Bajío de SJ	-	-	+	-	-	-
8	M	3 años	Pastor	Bajío de SJ	-	-	-	-	-	-
9	H	3 meses	Pastor	Calvillito	-	-	-	-	-	-
10	H	2 años	Mestizo	Pocitos	-	-	+	-	-	-
11	M	2 años	Mestizo	Tanque de Jiménez	-	-	+	-	-	-
12	H	2 años	Mestizo	Pocitos	Ooquiste-like <i>N. caninum</i>	-	+	-	-	-
13	M	12 años	Mestizo	Pocitos	-	-	-	-	-	-
14	M	2 años	Pastor	Pocitos	-	-	+	-	-	-
15	H	3 años	Mestizo	El Moquete	-	-	-	-	-	-
16	H	6 años	Mestizo	El Moquete	-	-	-	-	-	-
17	H	6 años	Mestizo	La Luz	Ooquiste-like <i>N. caninum</i>	-	+	-	-	-
18	M	7 meses	Pastor	Refugio de Peñuelas	-	-	+	-	-	-
19	H	7 años	Mestizo	Sn José Ordeña	-	-	+	-	-	-
20	H	2 años	Pastor	Sn José Ordeña	-	-	+	-	-	-
21	M	12 años	Pastor	Los Caños	-	-	-	-	-	-

22	H	2 años	Mestiza	Los Caños	-	-	-	-	-	-
23	H	4 años	Pastor	El Encanto	-	-	-	-	-	-
24	M	2 años	Pastor	Amarillas	-	-	+	-	-	-

+ positivo

-negativo

M = Macho

H = Hembra

Los resultados obtenidos en el Coyote (*Canis latrans*), indicaron que la muerte del mismo había sucedido aproximadamente 30 min antes de practicar el procedimiento y por los hallazgos encontrados en la necropsia se confirmó que la causa de muerte fue luxación cervical con listesis de C3 sobre C4 con sección medular completa a causa de impacto por vehículo automotor. El examen exterior permitió detectar la presencia de pulgas, que fueron identificadas como *Ctenocephalides* spp., la inspección del tracto gastrointestinal permitió observar que la cavidad gástrica se encontraba semi-vacía con la presencia de un ejemplar completo de *Rattus norvegicus*, en intestino delgado se encontraron ejemplares adultos de *Ancylostoma* spp.

El estudio molecular desarrollado en las muestras de los diferentes tejidos, sangre y heces, dio resultados negativos, ninguna de las muestras amplificó el fragmento deseado; en la figura 6, se muestran estos resultados.

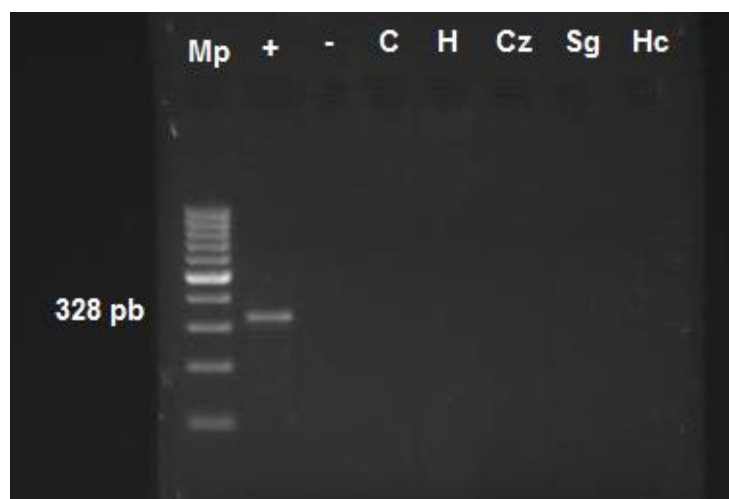


Figura 6. Gel de agarosa al 2.5% con los productos de amplificación de la PCR con los iniciadores Np21/Np6 para *N. caninum* en las muestras del coyote (*Canis latrans*). En la línea 1, marcador de peso molecular de 100 pb; línea 2, control positivo (328 pb); línea 3, control negativo; línea 4, muestra de cerebro;

línea 5 muestra de hígado; línea 6, muestra de corazón; línea 7, muestra de sangre y línea 8, muestra de heces.

El estudio histopatológico mostró áreas de gliosis e infiltración de células linfocitarias en cerebro (figura 7), sin mostrar ninguna otra anomalía aparente. En hígado y corazón no se observaron cambios histopatológicos.

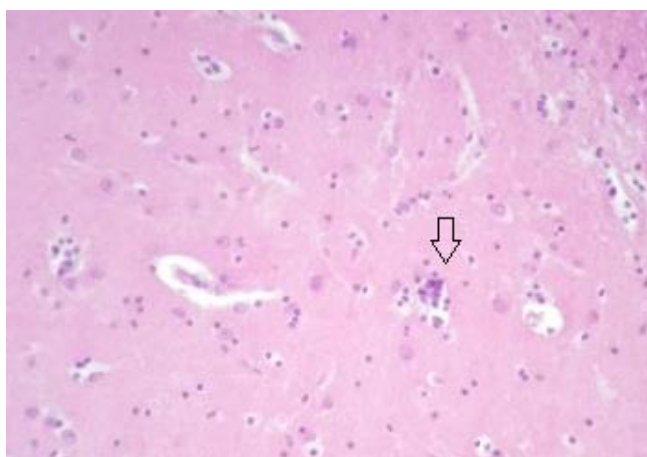


Figura 7. Corte histológico de cerebro de coyote (*Canis latrans*) HE. La fotomicrografía muestra un área de gliosis (flecha) y la presencia de algunas células linfocitarias.

La muestra de suero resultó positiva a la dilución 1:50. Por último el examen coproparasitoscópico, reveló la presencia de ooquistes de *Sarcocystis* spp., y huevos de *Ancylostoma* spp.; no se detectaron ooquiste-like de *N. caninum* (Figura 8).



Figura 8. Resultados del examen coproparasitológico del Coyote (*Canis latrans*); izquierda, ooquiste de *Sarcocystis* (100x); derecha, huevo de *Ancylostoma* (40x).

Los perros juegan un rol importante como hospedero definitivo y eventualmente intermediario en el ciclo de *N. caninum*, siendo elemento clave en la epidemiología de la enfermedad. En esta segunda etapa del estudio, se identificó una seroprevalencia de 54%, hecho interesante, pues este valor fue similar al identificado en la primera etapa del estudio donde se incluyeron solo perros asociados a las UPL. De los 24 perros incluidos en el estudio, 15 provenían de comunidades rurales del municipio de Aguascalientes, y 9 de áreas suburbanas, es decir, de colonias o asentamientos humanos de la periferia de la mancha urbana de la ciudad de Aguascalientes. Desafortunadamente, debido a que los perros eran entregados al CCABA por sus propietarios, no se tiene evidencia acerca de las condiciones de manejo, alimentación y alojamiento de los mismos. Sin embargo, con el solo dato de su procedencia, se puede intuir que los de áreas rurales se manejaban con más libertad y con una dieta más amplia, es decir, probablemente tenían más oportunidad de deambular fuera del predio doméstico e ingerir diversos alimentos e incluso hacer cacería de pequeños roedores o pájaros. Esto ayudaría a explicar la elevada seroprevalencia observada en esta etapa del estudio, es decir, las condiciones antes mencionadas ayudarían a que el parásito tuviera la oportunidad de infectar a los perros, los cuales en su mayoría eran adultos. En la literatura se menciona que la

seroprevalencia es muy diferente entre las poblaciones de perros, sin embargo, generalmente es mayor en perros de áreas rurales y asociados a establos lecheros, que los de áreas urbanas o perros de compañía o mascotas (Dubey *et al.*, 2007, 2011, 2017); en perros de áreas suburbanas en San Pablo, Brasil se ha encontrado 33% de seroprevalencia (Moraes *et al.*, 2008), mientras que en Bahia, Brasil 13% (Lopes-Sicupira *et al.*, 2012). En México, en perros de área urbana se ha reportado 20% mientras que en perros de establo 51 y 40.7% (Sánchez *et al.*, 2003; Cruz-Vázquez *et al.*, 2008), y en perros mascota 2% (Dubey *et al.*, 2007b).

El género de los perros no ha sido asociado como factor de riesgo/protección o predisponerte a la infección por *N. caninum* (Cerqueira-Cézar *et al.*, 2017; Dubey *et al.*, 2017), de tal forma que los resultados observados en el presente estudio, en donde las hembras tuvieron mayor seroprevalencia que los machos, se considera fortuito. Sin embargo, la edad si ha sido identificada como un factor de riesgo a la infección, perros de mayor edad tiene generalmente mayores oportunidades de tener contacto con el parásito a través de su vida y por ello este grupo etario muestra mayor seroprevalencia, como sucedió en el presente estudio (Cerqueira-Cézar *et al.*, 2017; Dubey *et al.*, 2017).

A pesar de que la seroprevalencia reportada en perros a nivel global es considerada alta, los estudios realizados sobre la prevalencia en la excreción de ooquistes de *N. caninum* en perros con infección natural es baja (Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011). Se han estudiado perros de establo en los cuales no fue posible detectar ooquistes de *N. caninum* en heces (Paradies *et al.* 2007), aunque la prevalencia de ooquistes-like de *N. caninum* en perros de áreas rurales y que conviven con ganado, varía entre 5.1% (Mitrea *et al.*, 2013) y 2.6% (Qian *et al.*, 2016), siendo mayor la identificada en el presente estudio (8%).

Los ooquistes de *N. caninum* son de tamaño muy parecido a los de otros protozoarios coccideos, principalmente a *Hammondia heydorni*, de tal forma que la

única forma de confirmar su presencia en heces es mediante una prueba de PCR (Dubey *et al.*, 2017). En el presente estudio, para la detección de ADN en heces se usaron iniciadores específicos, pero en todas las muestras procesadas no fue posible amplificar el fragmento deseado; resultados similares reportaron Regidor-Cerrillo *et al.* (2010), donde se observaron ooquistes-like de *N. caninum*, pero el número de ooquistes fue muy bajo (5 ooquistes por 1-2 gramo de heces), por lo que no pudo ser confirmado por PCR, caso similar al observado en nuestro estudio, donde la cantidad de ooquistes-like de *N. caninum* fue muy baja y eso no permitió su diagnóstico molecular. Qian *et al.* (2016), reportan dos muestras de heces positivas a ooquistes-like de *N. caninum* y siete por PCR de 78 muestras analizadas, interesante, que solo una de ellas resultó positiva tanto por microscopía como por PCR, estos resultados confirman la presencia de ADN del parásito en las heces, sin embargo la eliminación de ooquistes en las heces es de forma irregular en el huésped definitivo (Dubey y Schares, 2011), por lo tanto la detección directa de ooquistes en muestras de perros clínicamente sanos se dificulta y el número de ooquistes encontrados en perros con infección natural es muy bajo, por lo que algunas veces es indetectable por PCR (Regidor-Cerrillo *et al.* 2010) o por microscopía (Paradies *et al.* 2007).

El análisis de los cortes histológicos reveló que en ninguno de los 24 perros fue posible encontrar lesiones microscópicas sugestivas a la presencia de *N. caninum*, así como tampoco de quistes; las pruebas de PCR practicadas en los mismos tejidos de estos perros también resultaron negativas. En la literatura se menciona que *N. caninum* tiene preferencia por invadir células del tejido nervioso, cerebro y cerebelo, principalmente (Dubey *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2017). Recientemente, se han reportado casos con signos clínicos en perros adultos, en donde los animales son seropositivos (título 1:800), positivos mediante PCR en líquido cerebro-espinal y con lesiones sugestivas detectadas mediante resonancia magnética, pero sin realizar examen de heces en la búsqueda de ooquistes del parásito; en el estudio se atribuye que se trata de casos de infección crónica o latente asociada al consumo de carne cruda (Didiano *et al.*, 2020).

En el presente estudio, se identificaron perros seropositivos, negativos a presencia de ooquistes del parásito en heces, negativos a la prueba de PCR y sin lesiones microscópicas en el tejido blanco de la infección. La presencia de anticuerpos indica que los perros se encuentran en un medio ambiente que facilita el contacto con el parásito, inicialmente infectándose a través de la ingestión de carne cruda, tejidos fetales o desechos placentarios provenientes de ganado infectado o de algún otro huésped intermediario con los que pueden tener contacto y eventualmente consumirlos, tales como pájaros y pequeños roedores, es decir, mediante carnivorismo que es el medio que se reconoce como la principal fuente de infección horizontal en los caninos, lo que promovería inicialmente una respuesta inmune detectable en suero ya sea como primo-infección o en re-infecciones (Dubey *et al.*, 2017). Por otra parte, la infección horizontal a través de la ingestión de ooquistes ha sido demostrada a nivel experimental, lo que significa que el perro puede actuar como huésped intermediario, éstos perros fueron inoculados con una dosis de 10^4 ooquistes por vía oral y 30 días post-infección mostraron títulos de 1:1,600 pero no excretaron ooquistes en heces y tampoco mostraron signos clínicos, a la necropsia fueron negativos a la prueba de PCR, Inmunohistoquímica y tampoco prosperó el bioensayo en cuyos (Bandini *et al.*, 2011); estas evidencias hacen pensar que este mecanismo de transmisión es poco frecuente en los perros bajo condiciones de infección natural (Dubey y Schares, 2011), aunque también está documentado que bajo condiciones experimentales los perros pueden excretar ooquistes en heces hasta por seis meses de forma intermitente, incluso perros seronegativos (Lindsay, 1999; Rodrigues *et al.*, 2004).

De acuerdo a estos hechos y ante la falta de evidencia de la presencia de quistes o ADN del parásito en tejidos, resulta difícil inferir el origen de la infección en los perros. Sin embargo, tomando en cuenta la edad de los perros incluidos en el estudio, sus hábitos alimenticios y de comportamiento, es probable que, como sucede en el ganado bovino, los perros a lo largo de su vida hayan tenido tanto infecciones horizontales por carnivorismo como por ingestión de ooquistes, lo que de

cualquier forma induce a la producción de anticuerpos; la ausencia de lesiones sugestivas, quistes o ADN en los tejidos es difícil de explicar, sin embargo, cabe la posibilidad de que los perros seropositivos presentaran una infección subclínica, o bien, que se pueda pensar en una infección horizontal por ingestión de ooquistes, pues las evidencias son similares a las documentadas por Bandini *et al.* (2011); de cualquier forma, los resultados no demuestran la presencia de una infección crónica.

El coyote (*C. latrans*) es considerado de importancia epidemiológica en Norte América a pesar de los pocos reportes de la seroprevalencia de anticuerpos anti-*N.caninum* (Dubey *et al.*, 2017). Lindsay *et al.* (1996), Gondim *et al.* (2004b) y Bevins *et al.* (2013), en los Estados Unidos, reportan seroprevalencia de 11, 12 y 18%, respectivamente, mientras que en Canadá el 3.3% (Wapenaar *et al.*, 2007) y Alaska 16.7% (Stieve *et al.*, 2010); todos estos reportes coinciden en que los coyotes probablemente están expuestos a la infección por *N. caninum* través de múltiples vías, incluida la contaminación ambiental con ooquistes y la ingestión de presas silvestres infectadas, por lo tanto, el espécimen obtenido en este estudio quizá desarrollo anticuerpos de la misma manera al ser seropositivo a *N. caninum*, lo que sugiere que en la región estos animales pueden jugar un papel epidemiológico en los mecanismos de mantenimiento y transmisión del parásito. Por otra parte, los estudios realizados en heces son aún más escasos en coyotes que en perros. Moreno-Torres *et al.* (2018) detectan ADN de protozoarios de la clase de las coccidias en 51 caninos salvajes incluyendo al coyote, no obstante, ninguna fue positiva a *N. caninum*. A su vez, Klein *et al.* (2019), reportan en 10 de 100 muestras de heces de coyote positivas por PCR, pero sin observar ooquistes por microscopia, situación similar reportada por Li *et al.* (2014) en perros; en el presente estudio no fue posible detectar al parásito en heces.

8. CONCLUSIONES

1. La infección natural por *N. caninum* se encuentra presente en las poblaciones estudiadas mostrando una elevada seroprevalencia de anticuerpos específicos, lo que representa una evidencia de que los perros pueden infectarse y reinfectarse a través de la ruta de transmisión horizontal.
2. Los títulos de anticuerpos anti-*N. caninum* identificados en los caninos que conviven con el ganado lechero, así como la incidencia identificada, demuestran que en ese ambiente los perros se infectan y reinfectan continuamente. Los títulos detectados no se asociaron con cuadros clínicos.
3. La edad (>6 años), fue identificado como factor de riesgo a la infección natural por *N. caninum*, lo que indica que los perros adultos pueden tener más oportunidades de infectarse y reinfectarse con el parásito.
4. La seroprevalencia identificada en las poblaciones de ambientes rurales y suburbanos, es un hallazgo que confirma de que los perros están expuestos continuamente al parásito.
5. No se encontró evidencia de infección natural con excreción de ooquistes en heces, así como tampoco la presencia de infección natural crónica.

9. LITERATURA CITADA

- Almería, S., López-Gatius, F. 2013. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspect. *Research in Veterinary Science*. 95: 303-309.
- Anvari, D., Saberi, R., Sharif, M., Sarvi, S., Hosseini, S.A., Moosazadeh, M., Hosseininejad, Z., Chegeni, T.N., Daryani, A. 2020. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dog population worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Acta Parasitologica*. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00163-4>
- Asmare, K., Skjerve, E., Bekele, J., Sheferaw, D., Stachurska-Hagen, T., Robertson, L.J. 2014. Molecular identification of *Neospora caninum* from calf/foetal brain tissue and among oocysts recovered from faeces of naturally infected dogs in southern Ethiopia. *Acta Tropica*. 130: 88-93.
- Bandini, L.A., Neto, A.F.A., Pena, H.F.J., Cavalcante, G.T., Schares, G., Nishi, S.M., Gennari, S.M. 2011. Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 176: 151-156.
- Barber, J.S. 1998. Canine Neosporosis. *Waltham Focus*. 8: 25-29.
- Barber, J.S., Trees, A.J. 1998. Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *International Journal for Parasitology*. 28: 57-64.
- Barber, J.S., Trees, A.J. 1996. Clinical aspects of 27 cases of neosporosis in dogs. *The Veterinary Record*. 2: 439-443
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M.C., Hill, D.E., Kwork, O.C., Shen, S.K., Dubey, J.P. 2001. First isolation of *Neospora caninum* from the faces of naturally infected dog. *Journal of Parasitology*. 87: 612-618.
- Basso, W., Venturini, M.C., Bacigalupe, D., Kienast, M., Unzaga, J.M., Larsern, A., Machuca, M., Venturini, L. 2005. Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a boxer puppy from Argentina. *Veterinary Parasitology*. 131(3-4): 299-303.

- Basso, W., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., Schares, G., 2009a. First isolation of *Neospora caninum* from the faeces of a dog from Portugal. *Veterinary Parasitology*. 159: 162–166.
- Basso, W., Schares, S., Barwald, A., Herrmann, D.C., Conraths, F.J., Pantchev, N., Vrhovec, M.G., Schares, G., 2009b. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Veterinary Parasitology*. 160: 43–50.
- Benetti, A.H., Schein, F.B., Santos, T.R., Toniollo, G.H., Costa, A.J., Mineo, J.R., Lobato, J., Silva, D.A.O., Gennari, S.M. 2009. Pesquisa de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos leiteiros, caes e trabalhadores rurais da regioao Sudoeste do Estado de Mato Grosso. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 18(1): 29-33.
- Bjerkås, I., Mohn, S.F., Presthus, J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift Parasitenkunde*. 70: 271-274.
- Bjerkås, I., Dubey, J.P. 1991. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma-like* parasite of Norwegian dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 32: 407-410.
- Björkman, C., Lundén, A., Holmdahl, J., Barber, J., Trees, A.J., Uggla, A. 1994. *Neospora caninum* in dogs: Detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite Immunology*. 16: 643-648.
- Brasil, A.W.L., Nunes, R.P., Givanildo, J.S., De Sousa, C.A., Aparecido, R.M., Santos, S.A. 2018. Risk factors and anti-*Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibody occurrence in dogs in Joao Pessoa, Paraíba state, Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 27(2): 242-247.
- Bevins, S., Blizzard, E., Bazan, L., Whitley, P. 2013. *Neospora caninum* exposure in overlapping populations of coyotes (*Canis latrans*) and feral swine (*Sus scrofa*). *Journal of Wildlife Diseases*. 49(4): 1028-1032.
- Castañeda-Hernández, A., Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L. 2014. *Neospora caninum*: Seroprevalence and DNA detection in blood of sheep from Aguascalientes, México. *Small Ruminant Research*. 119: 182-186.

- Cedillo, C.J.R., Martínez, M.J.J., Santacruz, A.M., Banda, R.V.M., Morales, S.E. 2008. Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 154: 151-155.
- Cerqueira-Cézar, C.K., Calero-Bernal, R., Dubey, J.P., Gennari, S.M. 2017. All about Neosporosis in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 26: 253-279.
- Coelho, A.M., Cherubini, G., De Stefani, A., Negrin, A., Gutierrez-Quintana, R., Bersan, E., Guevar, J. 2018. Serological prevalence of toxoplasmosis and neosporosis in dogs diagnosed with suspected meningoencephalitis in the UK. *Journal of Small Animal Practice*. 1-7.
- Collantes-Fernández, E., Gómez-Bautista, M., Miró, G., Álvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Frisuelos, C., Ortega-Mora, L.M. 2008. Seroprevalence and risk factors associated with *Neospora caninum* infection in different dog populations in Spain. *Veterinary Parasitology*. 152: 148-151.
- Cole, R.A., Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Sorjonen, D.C., Dubey, J.P. 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *Journal of Parasitology*. 81(2): 208-211.
- Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L., Marentes, A., Morales-Salinas, E., García-Vázquez, Z. 2008. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* infection in dogs found in dairy farms and urban areas of Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 157: 139-143.
- De Sousa, M.E., Porto, W.J.N., Feitosa, P.P., de Sousa, O.L., Pinheiro, W., Aparecido, R. 2012. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs in the state of Alagoas, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 21(3): 287-290.
- Didiano, A., Monti, P., Taeymans, O., Cherubini, G.B. 2020. Canine central nervous system neosporosis: clinical, laboratory and diagnostic imaging findings in six dogs. *Veterinary Record Case Reports*. 8: e00095.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J. 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 193: 1259-1263.

- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 1989. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 50(9): 1578-9.
- Dubey, J.P., Metzger, F.L., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Fritz, D.L. 1995. Canine cutaneous neosporosis: clinical improvement with clindamycin. *Veterinary Dermatology*. 6(1): 37-43.
- Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Adams, D.S., Gay, J.M., Baszler, T.V., Blagburn, B.L., Thulliez, P. 1996. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *American Journal of Veterinary Research*. 57: 329-336.
- Dubey, J.P., Barr, B.C., Barta, J.R., Bjerkas, I., Bjorkman, C., Blagburn, B.L., Bowman, D.D., Buxton, D., Ellis, J.T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D.E., 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., Lindsay, D.S. 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidian. *International Journal for Parasitology*. 32: 929-946.
- Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W. 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*. 134: 267–289.
- Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, L.M. 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*. 120: 323-367.
- Dubey, J.P., Alvarado-Esquivel, C., Liesenfeld, O., Herrera-Flores, R.G., Ramírez-Sánchez, B.E., González-Herrera, A., Martínez-García, A., Bandini, L.A., Kwok, O.C.H. 2007b. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from Durango city, Mexico. *Journal of Parasitology*. 93(5): 1033-1035.
- 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 definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 27(181): 382-387.
- Dubey, J.P., Schares, G. 2011. Neosporosis in animals-the last five years. *Veterinary Parasitology*. 180: 90-108.
- Dubey, J.P., Hemphill, A., Calero-Bernal, R., Schares, G. 2017. Neosporosis in animals. CRC Press Taylor & Francis Group ISBN 13:978-1-4987-5254-1

- Dwinata, I.M., Oka, I.B.M., Agustina, K.K., Damriyasa, I.M. 2018. Seroprevalence of *Neospora caninum* in local Bali dog. *Veterinary World*. 11(7): 926-929.
- Experimental Pathology Research Laboratory, Division of Advanced Research Technologies. 2016 <https://med.nyu.edu/research/scientific-cores-shared-resources/sites/default/files/nyu-histocore-formalin-formaldehyde-fixation-recommendations.pdf> fecha de consulta 2 mayo del 2020.
- Ghalimi, F., China, B., Kaidi, R., Losson, B. 2009. First epidemiological study on exposure to *Neospora caninum* in different canine populations in the Algiers District (Algeria). *Parasitology International*. 58: 444–450.
- García-Vázquez, Z., Rosario, C.R., Ramos, A.A., Cruz-Vázquez, C., Mapes, S.G. 2005. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Veterinary Parasitology*. 134: 61-65.
- García-Vázquez, Z., Rosario, C.R., Mejía, E.F., Rodríguez, V.I., Romero, S.D., Fernández, R.M., Cruz-Vázquez, C. 2009. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle in three southern states of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*. 41(5): 749-753.
- Gao, X., Wang, H. 2019. Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* infection in dogs in rural northeastern mainland China. *Parasite*. 26 (32): 1-6.
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E. 2004a. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. 34: 159–161.
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Mateus-Pinilla, N.E., Pitt, W.C., Mech, L.C., Nelson, M.E. 2004b. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology*. 90(6): 1361-1365.
- Gondim, L.F. 2006. *Neospora caninum* in wildlife. *Trends in Parasitology*. 22: 247-252.
- 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.
- Guido, S., F. Katzer, I. Nanjiani, E. Milne, Innes, E. 2016. Serology- Based Diagnostic for the control of bovine Neosporosis. *Trends in Parasitology*. 32: 131-143.

- Gutiérrez, G.J., Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L., Valdivia-Flores, A., Islas-Ojeda, E., García-Vázquez, Z. 2007. Factores de Manejo asociados con la seroprevalencia a la infección por *Neospora caninum* en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Veterinaria México*. 38(3): 261-270.
- Hendrix, C.M., Robinson, E. 2006. Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians. Mosby Elsevier. Third edition
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., Sturdivant, R.X. 2013. Applied Logistic Regression, 3th ed. Wiley: New Jersey.
- Hosseininejad, M., Mahzounieh, M., Shams, E.N. 2017. *Neospora caninum* suspects as one of the most important causes of abortion in large dairy farms in Isfahan, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 12(3): 408-412.
- Khan, A., Shaik, J.S., Sikorski, P., Dubey, J.P., Grigg, M.E. 2020. Neosporosis: An overview of its molecular epidemiology and pathogenesis. *Engineering*. 6: 10-19.
- King, J.S., Slapeta, J., Jenkins, D.J., Al-Qassab, S.E., Ellis, J.T., Windsor, P.A. 2010. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. 40(8): 945-950.
- King, J.S., Brown, G.K., Jenkins, D.J., Ellis, J.T., Fleming, P.J.S., Windsor, P.A., Slapeta, J. 2012. Oocyst and high seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs living in remote Aboriginal communities and wild dogs in Australia. *Veterinary Parasitology*. 187: 85-92.
- Klein, C., Barua, S., Liccioli, S., Massolo, A. 2019. *Neospora caninum* DNA in Coyote fecal samples collected in an urban environment. *Journal of Wildlife Diseases*. 55(1):1-4.
- Kul, O., Atmaca, H.T., Anteplioglu, T., Ocal, N., Canpolat, S. 2015. *Neospora caninum*: the first demonstration of the enteroepithelial stages in the intestines of a naturally infected dog. *Journal of Comparative Pathology*. 153: 9-13.
- Legnani, S., Pantchev, N., Forlani, A., Zini, E., Schares, G., Bazler, J., Roccabianca, P., Ferris, F., Zanna, G. 2016. Emergence of cutaneous neosporosis in a dog receiving immunosuppressive therapy: molecular identification and management. *Veterinary Dermatology*. 27:49-e14.
- Lima-Acosta, I., D Avila, C.L., Sousa, S.H., Marcili, A., Naegeli, M., Rossi, J., Gennari, S. 2016. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*

- antibodies in dogs from rural properties surrounding a biological reserve, Espirito Santo, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 25: 536-539.
- Li, J., He, P., Yu, Y., Du, L., Gong, P., Zhang, G., Zhang, X. 2014. Detection of *Neospora caninum*-DNA in feces collected from dogs in Shenyang (China) and ITS-1 phylogenetic analysis. *Veterinary Parasitology*. 205: 361-364.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P. 1989a. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *American Journal of Veterinary Research*. 50: 1981-83.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P. 1989b. Evaluation of anti-coccidial drugs' inhibition of *Neospora caninum* development in cell cultures. *Journal of Parasitology*. 75: 990-992.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P. 1990. Effects of sulfadiazine and amprolium on *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. *Journal of Parasitology*. 76: 177-179.
- Lindsay, D.S., Kelly, E.J., McKown, R.D., Stein, F.J., Plozzer, J., Herman, J., Blagburn, L., Dubey, J.P. 1996. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Antibodies in Coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of Coyotes with *Neospora caninum*. *Journal of Parasitology*. 82(4): 657-659.
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P., Duncan, R.B. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 82: 327–333.
- Lopes-Sicupira, P.M., Carvalho, S.V., Da Silva, G.G., Salim, P.M.J., Pita, G.L.F. 2012. Factors associated with infection by *Neospora caninum* in dogs in Brazil. *Veterinary Parasitology*. 185: 305-308.
- Lyon, C. 2010. Update on the diagnosis and management of *Neospora caninum* infections in dogs. *Topics in Companion Animal Medicine*. 25(3): 170-175.
- Macedo, R.J., Guimaraes, A., Martins, M.L., Azevedo, S.L., Lopes, N.L., Minharro, B.S., Sandes, P.M., Azevedo, S.H., Massard, C.L., Zacarias, M.R., Divan, B.C. 2015. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dogs from the state of Tocantis: serology and associated factors. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 24(4): 475-481.

- Machacova, T., Bartova, E., Sedlak, K., Slezakova, R., Budikova, M., Piantedosi, D., Veneziano, V. 2016. Seroprevalence and risk factors of infections with *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in hunting dogs from Campania region, southern Italy. *Folia Parasitologica*. 63:012
- Magaña, A., Sánchez, F., Villa, K., Rivera, L., Morales, E. 2015. Systemic neosporosis in a dog treated for immune-mediated thrombocytopenia and hemolytic anemia. *Veterinary Clinical Pathology*. 44(4): 592-597.
- McAllister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., McGuire, A.M., 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. 28: 1473–1478.
- McGarry, J.W., Stockton, C.M., Williams, D.J.L., Trees, A.J. 2003. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *Journal of Parasitology*. 89: 628-630.
- McInnes, L.M., Irwin, P., Palmer, D.G., Ryan, U.M. 2006. In vitro isolation and characterization of the first canine *Neospora caninum* isolate in Australia. *Veterinary Parasitology*. 137: 355-363.
- Medina, E.L., Cruz-Vázquez, C., Quezada, T.T., Morales, S.E., García-Vázquez, Z. 2006. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy herds in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 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, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 191(1): 11-14.
- Medina-Esparza, L., De Luna-Oseguera, R., Vitela-Mendoza, I., Cruz-Vázquez, C. 2018. Detección de *Neospora caninum* en ganado lechero sacrificado en Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 9: 408-419.
- Mitreă, I. L., Enăchescu, V., Ionita, M. 2013. *Neospora caninum* infection in dogs from southern Romania: coproparasitological study and serological follow-up. *Journal of Parasitology*. 99 (2): 365-367.
- Moraes, C.C.G., Megid, J., Pituco, E.M., Okuda, L.H., Del Fava, C., De Stefano, E., Crocci, A.J. 2008. Occurrence of antibodies anti-*Neospora caninum* in dogs of

- Botucatu range Micro región the State of Sao Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 17(1): 1-6.
- Morales, E., Trigo, F.J., Ibarra, F., Puente, E., Santacruz, M. 2001. Neosporosis in Mexican Dairy Herds: Lesions and Immunohistochemical Detection of *Neospora caninum* in fetuses. *Journal of Comparative Pathology*. 125: 58-63.
- Moreno-Torres, K., Sinnott, D.M., Wolfe, B.A., Marsh, A.E., Saville, W.J.A., Moritz, M., Garaded, R.B. 2017. Risk of environmental exposure to small coccidian from wild canid feces in rural Ohio. *American Journal of Veterinary Research*. 79(11): 1179-1187.
- Nazir, M.M., Maqbool, A., Akhtar, M., Ayaz, M., Ahmad, A.N., Ashraf, K., Ali, A., Alam, M.A., Ali, M.A., Khalid, A.R., Lindsay, D.S. 2014. *Neospora caninum* prevalence in dogs raised under different living conditions. *Veterinary Parasitology*. 204: 364-368.
- Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/133499/4.-_NORMA_OFICIAL_MEXICANA_NOM-033-SAG-ZOO-2014.pdf 23 abril del 2020
- Okumu, T.A., Munene, J.N., Wabacha, J., Tsuma, V., Van Leeuwen, J. 2016. Seroepidemiological survey of *Neospora caninum* and its risk factors in farm dogs in Nakuru district, Kenya. *Veterinary World*. 9(10): 1162-1166.
- Olamendi-Portugal, M., Caballero-Ortega, H., Correa, D., Sanchez-Aleman, M.A., Cruz-Vazquez, C., Medina-Esparza, L. 2012. Serosurvey of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in white-tailed deer from Northern Mexico. *Veterinary Parasitology*. 189: 369–373.
- Palavicini, P., Romero, J., Dolz, G., Jiménez, A., Hill, D., Dubey, J. 2007. Fecal and serological survey of *Neospora caninum* in farm dogs in Costa Rica. *Veterinary Parasitology*. 149: 265-270.
- Paradies, P., Capelli G., Testini, G., Cantacessi, C., Trees, J., Otranto, D. 2007. Risk factors for canine neosporosis in farm and kennel dogs in southern Italy. *Veterinary Parasitology*. 145: 240-244.

- Paré, J., Hietala, S.K., Thurmond, M.C. 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 7: 352-359.
- Perrucci, S., Gavazza, A., Rocchigiani, G., Nardoni, S., Zbriger, A., Lubas, G., Mancianti, F. 2017. *Neospora caninum* oocyst shedding in a naturally infected dog from Italy. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 8: 10-12.
- Pescador, C.A., Corbellini, L.G., Oliveira, E.C., Raymundo, D.L., Driemeier, D. 2007. Histopathological and immnohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. *Veterinary Parasitology*. 150: 159-163.
- Pinto-Ferreira, F., Pasquali, A.K.S., Thomaz-Soccol, V., Mitsuka-Breganó, R., Caldart, E.T., Leandro, A.D.S., Chiyo, L., Pozzolo, E.M., Cubas, P., Giordano, L.G.P., Petterle, R.R., Navarro, I.T. 2019. Epidemiological relevance of dogs for the prevention of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Leptospira* spp. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 28(3): 383-394.
- Qian, W., Wang, T., Yan, W. 2016. Occurrence and first multilocus microsatellite genotyping of *Neospora caninum* from naturally infected dogs in dairy farms in Henan, Central China. *Parasitology Research*. 115: 3267-3273.
- Razmi, G. 2009. Fecal and Molecular Survey of *Neospora caninum* in farm and household Dogs in Mashhad Area, Khorasan Province, Iran. *Korean Journal of Parasitology*. 47(4): 417-420.
- Reichel, M.P., Thornton, R.N., Morgan, P.L., Mills, R.J.M., Schares, G. 1998. Neosporosis in a pup. *New Zealand Veterinary Journal*. 46(3): 106-110.
- Reichel, M.P., Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L., Ellis, J.T. 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The billion dollar question. *International Journal for Parasitology*. 43: 133-142.
- Regidor-Cerrillo, J., Pedraza Díaz, S., Rojo-Montejo, S., Vazquez-Moreno, E., Arnaiz, I., Gomez-Bautista, M., Jimenez-Palacios, S., Ortega-Mora, L., Collantes-Fernandez, E. 2010. *Neospora caninum* infection in stray and farm dogs: Seroepidemiological study and oocyst shedding. *Veterinary Parasitology*. 174: 332-335.

- Robbe, D., Passarelli, A., Gloria, A., Di Cesare, A., Capelli, G., Iorio, R., Traversa, D. 2016. *Neospora caninum* seropositivity and reproductive risk factors in dogs. *Experimental Parasitology*. 164: 31-35.
- Rodrigues, A.A.R., Gennari, S.M., Aguiar, D.M., Sreekumar, C., Hill, D., 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. *Veterinary Parasitology*. 124: 139–150.
- Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J.P. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research*. 84: 50-53.
- Romero-Salas, D., García-Vázquez, Z., Montiel-Palacios, F., Montiel-Peña, T., Aguilar-Domínguez, M., Medina-Esparza, L., Cruz-Vázquez, C. 2010. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in cattle in Veracruz, México. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9: 1445-1451.
- Romo-Gallegos, J.M., Cruz-Vázquez, C., Medina-Esparza, L., Ramos-Parra, M., Romero-Salas, D. 2019. Prevalence and risk factors of *Neospora caninum* infection in ovine flocks of central-western Mexico. *Acta Veterinaria Hungarica*. 67: 51-59.
- Sánchez, G.F., Morales, S.E., Martínez, M.J., Trigo, F.J. 2003. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 67(2): 142-145.
- Schares, G., Pantchev, N., Barutzki, D., Heydorn, A.O., Bauer, C., Conraths, F.J. 2005. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *International Journal for Parasitology*. 35: 1525-1537.
- Schüle, C., Rehbein, S., Shukullari, E., Rapti, D., Reese, S., Silaghi, C. 2015. Police dogs from Albania as indicators of exposure risk to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and vector-borne pathogens of zoonotic and veterinary concern. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 1-2: 35-46.
- Sinnott, F.A., Garcia, M.L., Farias, C.T., Maraninchi, S.R., Borsuk, S. 2017. Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis (years 2011-2016). *Veterinary Parasitology*. 239: 19-25.

- Slapeta, J.R., Modry, D., Kyselova, I., Horejs, R., Lukes, L., Koudela, B. 2002. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Veterinary Parasitology*. 109: 157-167.
- Sloan, S., Slapeta, J., Jabbar, A., Hunnam, J., De Groef, B., Rawlin, G., McCowan, C. 2017. High seroprevalence of *Neospora caninum* in dogs in Victoria, Australia, compared to 20 years ago. *Parasites & Vectors*. 10: 503.
- Snak, A., Garcia, F.G., Lara, A.A., Jesus-Pena, H.F. Osaki, S.C. 2018. *Neospora caninum* in properties in the west region of Paraná, Brazil: prevalence and risk factors. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 27(1): 51-59.
- Souza, S.L.P., Guimarães, J.S., Ferreira, F., Dubey, J.P., Gennari, S.M. 2002. Prevalence of *Neospora caninum* antibodies in dogs from dairy cattle farms in Parana, Brazil. *The Journal of Parasitology*. 88: 408-409.
- Souza, I.B., Fernandes, P.R., Mota, S.T., Brito, S.C., Marinho, S.N., Cruz, U.F., Aparecida, C.G., Camara, A.L., Aparecido, M.R., Nascimento, R.R. 2019. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs from an urban area of North-eastern Brazil: a spatial approach. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*. 52: e20180440 1-3
- StataCorp. 2009. Software for statistics and data science, version 10.1. StataCorp LLC, College Station, Texas (www.stata.com)
- Stieve, E., Beckmen, K., Kania, S.A., Widner, A., Sharon, P. 2010. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody prevalence in Alaska wildlife. 46(2): 348-355.
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, F.J. 1979. Diagnostic de verminose par examen coprologique. Janssen Research Foundation, Beerse, Belgique, p.p 35-36.
- Thrusfield, M. 2018. *Veterinary Epidemiology*. Fourth edition. Wiley Blackwell Publishing.
- Václavek, P., Sedlák, K., Hůrková, L., Vodrážka, P., Šebesta, R., Koudela, B. 2007. Serological survey of *Neospora caninum* in dogs in the Czech Republic and long-term study of dynamics of antibodies. *Veterinary Parasitology*. 143: 35-41.

- Villagra-Blanco, R., Angelova, L., Conze, T., Schares, G., Barwald, A., Taubert, A., Hermosilla, C., Wehrend, A. 2018. Seroprevalence of *Neospora caninum*-specific antibodies in German breeding bitches. *Parasites & Vectors*. 11: 96.
- Wang, S., Yao, Z., Zhang, N., Wang, D., Ma, J., Liu, S., Zheng, B., Zhang, B., Liu, K., Zhang, H. 2016. Serological study of *Neospora caninum* infection in dogs in central China. *Parasite*. 23: 25.
- Wapenaar, W., Barkema, H.W., Schares, G., Rouvinen-Watt, K., Zeijlemaker, L., Poorter, B., O'Handley, R.M., Kwok, O.C.H., Dubey, J.P. 2007. Evaluation of four serological techniques to determine the seroprevalence of *Neospora caninum* in foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*) on Prince Edward Island, Canada. *Veterinary Parasitology*. 145: 51-58.
- Yamaga, 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). *The Journal of Parasitology*. 82(2): 272-279.

Anexo 1

Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Procesos Agropecuarios
Proyecto Neosporosis en perros



Cédula de Identificación

Unidad de Producción Lechera

Nombre UPL		No. identificación
Propietario		Ubicación
Función zootécnica ☐ producción lechera ☐ mixta	Medicina preventiva ☐ vacunas ☐ desparasitaciones	
Número de animales Producción	Enfermedades más comunes	
Presencia de otras especies animales productivas en la UPL	Problemas reproductivos / abortos	

¿Tienen perros? ¿Cuántos? Otros animales ☐ gatos ☐ otros	Comentarios
Los perros tienen acceso a comida o agua (ambos) destinado para consumo del ganado ☐ si ☐ no Los perros tienen acceso a las placentas / fetos abortados (ambos) ☐ si ☐ no	

Anexo 2

Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Procesos Agropecuarios
Proyecto Neosporosis en perros



Cédula de Identificación perro

Nombre		No. Identificación	
Sexo () Hembra () Macho	Edad		Raza
Función zootécnica () guardia / protección () compañía () ninguna () solo llego y ahí esta	Medicina preventiva () vacunas () desparasitaciones		
Examen clínico () presencia de ectoparásitos () enfermedad crónica () clínicamente sano () otro		Comentarios	

Domicialización () vive en el rancho (no sale) () libre acceso (entra y sale de rancho) () solo va al rancho a comer pero no vive	Hábitos () convive con el ganado () entra y sale de los corrales () acceso a los comederos y bebederos de los corrales () acceso áreas de almacén de alimentos () convive con otros animales dentro del rancho (perros, gatos) () defeca dentro de corrales, comederos () Caza ratas/ratones
Alimentación () alimento comercial () residuos de comida casera () residuos de tejidos placentarios / abortos () leche () cacería (conejos, pájaros) () otro	

Observaciones	
----------------------	--

Anexo 3

Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Procesos Agropecuarios
Proyecto Neosporosis en perros



Cédula de Identificación perro / necropsia CCABA

No. Identificación		Fecha	
Sexo ☐ Hembra ☐ Macho	Edad	Raza	
Procedencia		Comentarios / motivo de ingreso	

Muestras ☐ cerebro ☐ sangre ☐ heces ☐ otro _____		Observaciones
Prueba	Fecha realización	Resultado
PCR cerebro		
Histología		
IFI		
Coprología		
PCR heces		

Observaciones	
----------------------	--

Anexo 4

Journal of Parasitology 2020 106(2) 312–315
© American Society of Parasitologists 2020

Published 24 April 2020

Contents and archives available through www.bioone.org or www.jstor.org

Journal of Parasitology

journal homepage: www.journalofparasitology.org

DOI: 10.1645/18-203



PREVALENCE, INCIDENCE, AND RISK FACTORS FOR INFECTION BY *NEOSPORA CANINUM* IN DAIRY FARM DOGS IN NORTH-CENTRAL MEXICO

I. De Velasco-Reyes¹, C. Cruz-Vázquez¹, L. Medina-Esparza¹, I. Vitela-Mendoza¹, C. A. Ángel-Sahagún², and J. F. Gómez-Leyva³

¹ Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, Km. 18 carretera Aguascalientes, San Luis Potosí, El Llano, 20330, Aguascalientes, México.

² División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Ex Hacienda El Copal, km. 7 carretera Irapuato-Silao, 36500, Irapuato, Guanajuato, México.

³ Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Tecnológico Nacional de México. Km 10 carretera Tlajomulco, San Miguel Cuyutlán, 45640, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México.

Correspondence should be sent to C. Cruz-Vázquez (<http://orcid.org/0000-0003-0970-6811>) at: cruva18@yahoo.com.mx

KEY WORDS ABSTRACT

<i>Neospora caninum</i>	The purpose of this study was to describe the prevalence and incidence of <i>Neospora caninum</i>
Dogs	infection in dogs that are in close contact with dairy cattle and to identify possible risk factors
Prevalence	associated with the infection in this population. Twenty-four dogs located in 8 different dairy farms
Incidence	of Aguascalientes, Mexico, were evaluated for a 6-mo period. Once a month a sample of serum and a
Risk factors	sample of peripheral blood was collected. The serum was used to detect antibodies against <i>N.</i>
Mexico	<i>caninum</i> by means of the indirect immunofluorescence technique, and the blood was used to detect

Downloaded from <http://meridian.allenpress.com/journal-of-parasitology/article-pdf/106/2>