

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD Y ANATOMIA ANIMALES

Estudio de la neosporosis en vacuno lechero en Cataluña

MARCELA PABÓN VALVERDE

TESIS DOCTORAL, 2007

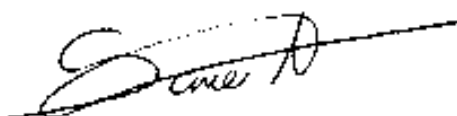
La Dra. SONIA ALMERÍA de la MERCED, Profesora Titular de Universidad del Área de Conocimiento de Sanitat Animal del Departamento de Sanitat i Anatomia Animals, Facultat de Veterinaria (Universitat Autònoma de Barcelona) y el Dr. Fernando López Gatus, Catedrático de Universidad del Departamento de Producción Animal, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agraria (Universitat de Lleida)

CERTIFICAN:

Que Doña Marcela Pabón Valverde ha realizado la tesis doctoral que tiene por título "ESTUDIO DE LA NEOSPOROSIS EN VACUNO LECHERO EN CATALUÑA" bajo nuestra dirección.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado

Bellaterra, 1 de Febrero 2007.



Dra. Sonia Almería de la Merced



Dr. Fernando López Gatus



Universitat Autònoma de Barcelona
Servei de Biblioteques
Biblioteca de Ciències de la Salut i
Herbari de Ciències de la Salut

INDICE

RESUMEN	Pág. 1
SUMMARY	Pág. 3
1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	Pag. 11
1. Introducción Histórica	Pag. 11
2. Taxonomía	Pag. 11
3. Ciclo parasitario:	Pag. 12
3.1. Taquizoitos	Pag. 12
3.2. Bradizoitos y quistes	Pag. 13
3.3. Ooquistes	Pag. 14
3.4. Transmisión	Pag. 15
3.4.1. T. Horizontal	Pag. 15
3.4.2. T. Vertical	Pag. 16
3.5. Ciclo silvático	Pag. 16
4. Distribución y prevalencia en ganado vacuno	Pag. 17
5. Patogenia en ganado vacuno	Pag. 18
5.1. Invasión celular	Pag. 18
5.2. Patogenia del aborto	Pag. 19
5.3. Reactivación de una infección latente	Pag. 19
6. Factores de riesgo asociados a la infección	Pag. 20
6.1. Aptitud y manejo del rebaño	Pag. 20
6.2. Raza	Pag. 21
6.3. Edad	Pag. 21
6.4. País o zona de procedencia	Pag. 21

6.4.1. <i>Neospora</i> en ganado vacuno en España	Pag. 21
6.5. Otros factores	Pag. 22
7. Aspectos inmunológicos en la infección en ganado vacuno	Pag. 22
7.1. Respuesta inmune celular	Pag. 22
7.2. Respuesta inmune humoral	Pag. 23
7.3. Respuesta inmune en hembras gestantes	Pag. 23
8. Cuadro clínico y lesional en ganado vacuno	Pag. 25
8.1. En adultos	Pag. 25
8.2. Aborto epidémico y aborto endémico	Pag. 26
8.3. Animales neonatales	Pag. 26
9. Diagnóstico	Pag. 26
9.1. Técnicas para la detección de anticuerpos de <i>Neospora caninum</i>	Pag. 27
9.1.1. Inmunoblott	Pag. 27
9.1.2. IFI	Pag. 27
9.1.3. ELISA indirecto	Pag. 28
9.1.4. ELISA de avidéz	Pag. 28
9.1.5. Aglutinación directa	Pag. 28
9.2. Técnicas de detección directa de <i>Neospora caninum</i>	Pag. 28
9.2.1. Diagnóstico histopatológico	Pag. 29
9.2.2. Inmunohistoquímica	Pag. 29
9.2.3. PCR	Pag. 29
9.3. Diagnóstico diferencial	Pag. 30
10. Tratamiento, control y profilaxis	Pag. 30
10.1. Tratamiento	Pag. 30
10.2. Control en rebaños infectados	Pag. 31

10.3. Profilaxis	Pag. 32
11. Bibliografía	Pag. 32
II. MATERIALES Y MÉTODOS	Pag. 41
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	Pag. 47
CAPÍTULO I.	Pag. 47
<i>Neospora</i> -associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in North-east Spain. <i>Journal of Veterinary Medicine B</i> , 51, 348-352. 2004.	
CAPÍTULO II.	Pag. 48
<i>Neospora caninum</i> infection does not affect early pregnancy. 2004. <i>Theriogenology</i> , 62, 606-613.	
CAPÍTULO III.	Pag. 49
Diagnóstico de la infección por <i>Neospora caninum</i> rebaños lecheros: comparación de técnicas serológicas.	
CAPÍTULO IV.	Pag. 56
Respuesta inmune humoral frente a <i>Neospora caninum</i> durante la gestación.	
CAPÍTULO V.	Pag. 67
Chronic infection of <i>Neospora caninum</i> and repeated abortion in dairy cows: a 3-year study. Sometido para publicación en <i>Veterinary Parasitology</i> .	
IV. DISCUSIÓN GENERAL	Pag. 79
V. CONCLUSIONES	Pag. 89

RESUMEN

La presente tesis consiste en un análisis de la infección por *N. caninum* en ganado vacuno lechero en Cataluña basado en análisis serológicos de rebaños completos.

Este trabajo supone el primer estudio de un brote de aborto causado por *Neospora caninum* en una granja de alta producción lechera de Cataluña, en Lleida. El estudio reproductivo, serológico y la evidencia del parásito mediante técnica de PCR en fetos permitió establecer una relación causal del brote de aborto por *N. caninum*. En el estudio un 44% de las vacas seropositivas abortaron en el periodo de 1 año, pasando de un nivel medio del 10% de aborto en el rebaño en años anteriores a un 23,2%. El aborto ocurrió principalmente en el segundo trimestre de gestación. El riesgo de aborto fue 12,2 veces mayor en los animales seropositivos comparados con los seronegativos. El estudio serológico a nivel de rebaño completo, en animales de varias generaciones, madres y sus hijos/hijas con una transmisión congénita mayor al 90% puso en evidencia la transmisión transplacentaria como la vía más importante en el mantenimiento de la infección en los rebaños en nuestra zona. Los resultados indicaron que la serología materna es un buen indicador del riesgo de aborto en la neosporosis, mientras que factores de riesgo de aborto habituales en la zona, tales como la edad de los animales (novilla-vaca) y la estación de inicio de gestación, quedan enmascarados en una infección por *Neospora*.

En un segundo estudio se evaluaron los factores de riesgo que influyen en la infección por *Neospora caninum* en dichas granjas que habían presentado historial de problemas reproductivos mediante el estudio del efecto de la infección por *Neospora* y la presencia de aborto en un total de 2773 gestaciones analizadas. Este estudio confirmó de nuevo la importancia de los abortos por *Neospora* en el segundo trimestre de gestación, poniendo en evidencia que en los animales infectados crónicamente antes de la gestación, la parasitación no tiene efecto abortivo en el periodo fetal temprano pero este se hace evidente tras los 90 días de gestación. En los abortos ocurridos antes de los 90 días de gestación, los principales factores de riesgo fueron el estado reproductivo de los animales, mayor riesgo en animales con partos previos comparados con novillas, y en las gestaciones en las épocas cálidas con mayor riesgo que en épocas templadas. Por el contrario, tras los 90 días el único factor de riesgo incluido en el modelo de regresión múltiple fue la serología positiva a *Neospora* con un riesgo de aborto 18,9 (riesgo relativo de 12,9 a 27,8) veces mayor en animales seropositivos, confirmando los resultados previos y poniendo en evidencia a *Neospora* como una de las principales causas de aborto en la zona durante este periodo. Las prevalencias fueron variables pero se pudo observar una clara relación con los cuadros de aborto incluso en las granjas con prevalencias más reducidas.

Tras evidenciar a la infección por *Neospora* como causa de abortos en la zona, se procedió a la valoración serológica de varios rebaños cercanos para conocer la prevalencia de infección de esta parasitación en la zona, comparándose los resultados obtenidos mediante dos técnicas serológicas de ELISA Herdcheck (IDEXX, EE.UU) y CIVTEST (Hipra, España) en un total de 2435 animales procedentes de 5 rebaños. Se observaron importantes variaciones en los valores de seroprevalencia en los rebaños, con niveles desde 3,5% y 3,8% a 34,3% y 31,6% con las técnicas Herdcheck y CIVTEST, respectivamente. La concordancia entre ambas pruebas fue muy elevada, con un valor kappa medio de las explotaciones de 0,94 (0,82 a 0,96). Los resultados sugieren que ambos ELISAs pueden utilizarse indistintamente en el análisis de muestras de ganado vacuno lechero adulto. Únicamente se pudieron observar pequeñas discrepancias en algunas muestras. El análisis de las muestras discordantes en los

El ISAs mediante IFI, no ayudó a descifrar cuál de los dos ELISA permitía una mejor verificación de las muestras con resultados discordantes. En el caso de estos animales con resultados dudosos, un seguimiento de los mismos con muestreos posteriores a lo largo del tiempo ayudaría a reconocerlos como claramente seropositivos o seronegativos en los rebaños. Los resultados confirmaron la importancia de la neosporosis en Cataluña y que su relación con los cuadros de aborto debe ser tomada en cuenta en los protocolos de diagnóstico.

En un cuarto estudio se procedió al análisis serológico a lo largo de toda la gestación en 23 vacas gestantes, 16 de ellas seropositivas en anteriores análisis serológicos, para el estudio de la dinámica de anticuerpos en animales crónicamente infectados a lo largo de toda la gestación. Los títulos de anticuerpos frente a *N. caninum* en los animales seropositivos permanecieron elevados por encima del umbral de seropositividad en la mayoría de los animales durante la gestación. En general, la dinámica de anticuerpos fue muy homogénea tanto en los animales que abortaron como en los que no abortaron, y supuso un aumento de los niveles a partir del segundo trimestre de gestación, lo que sugiere una reactivación de la infección en este período. Los animales que abortaron presentaron en general niveles de anticuerpos máximos superiores a la media del resto de los animales seropositivos antes de que ocurriera el aborto. La observación de un pico de anticuerpos en animales infectados por *N. caninum* antes de ocurrir el aborto podría sugerir una reactivación de la infección y paso de taquizoitos a los fetos pues entre los bovinos no hay transferencia de anticuerpos de la madre al feto durante la gestación.

Por último, en un quinto estudio se valoró la tasa de repetición de abortos asociados a la infección por *Neospora* en 1 rebaño analizado a lo largo de 3 años, en el que un grupo de 122 animales permaneció estable en el rebaño durante los 3 años del estudio. La seroprevalencia media del rebaño disminuyó del 31,7% del primer año al 24,8% el segundo y al 19,9% el tercer año de estudio, mientras el índice de abortos pasó del 20,6% el primer año de estudio al 5,5% el segundo y fue del 9,9% en el tercero, gracias a la instauración de medidas de control a partir del segundo año de estudio tales como la eliminación de animales seropositivos que hubieran abortado y la inseminación de animales seropositivos con semen de vacuno de carne. Del total de abortos en animales seropositivos, el 51% de los animales repitieron abortos y de ellos el 36,8% habían tenido abortos previos. En los 122 animales sólo 4 animales seroconvirtieron en el segundo año y el resto mantuvieron su estado serológico a lo largo de 3 años. La prevalencia pasó del 18% el primer año al 21,3% el resto de los años. El aborto repetitivo tuvo lugar en un 61,5% de los animales seropositivos y de ellos 26,7% habían sufrido aborto con anterioridad. Los resultados indican una gran estabilidad de la presencia de anticuerpos frente *N. caninum* en los animales crónicamente infectados y la utilidad de un muestreo anual de los rebaños completos para el conocimiento epidemiológico de la infección y la aplicación de medidas de control apropiadas en los rebaños.

El elevado índice de abortos repetitivos vacas seropositivas indica que la infección por *Neospora* no produce inmunidad suficiente en los animales para evitar abortos en sucesivas gestaciones.

En resumen, los resultados indican la importancia de la neosporosis en Cataluña y a partir de los datos obtenidos se procederá a la aplicación de medidas de control racionales e integradas que permitan disminuir la infección y sus efectos en los animales afectados.

SUMMARY

The present PhD thesis is a complete study of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Catalonia, Spain, based on whole herd serological screening. The study reports the first *Neospora*-associated abortion episode in a dairy herd in Catalonia, in Lleida. During the 1-year study period, the overall abortion rate for the herd was 23.2%, having been 10% in the years before the study. The data analysed were those derived from blood samples collected from the whole herd and data from diagnosed pregnancies. Antibodies to *N. caninum* were found in 35.4% of the cattle; 44% of seropositive pregnant animals aborting over 1 year period. Based on the odds ratio, the risk of abortion was 12.2 times higher ($P < 0.0001$) in the *Neospora* seropositive animals than in seronegative animals, and significantly higher during the second term of gestation ($P < 0.01$) than during the first and third terms. Abortions were not found to be associated with parity status or season of pregnancy, common risk factors associated with pregnancy loss in the geographical area of the study. Age-related differences in *N. caninum* seroprevalence were not statistically significant, indicating vertical transmission as the main route of infection. Indeed, a high percentage of congenitally infected offspring was observed (90.6%), and the farm had been free of dogs for the last 7 years. Our results suggest that, in an increased incidence of abortions due to neosporosis in dairy cattle, maternal serology can be a good indicator of abortion risk and that abortion-linked management factors, such as parity and pregnancy season, may be masked.

A second study was designed to evaluate the relationship between *Neospora caninum* infection prior to pregnancy, as determined through maternal serology, and the subsequent occurrence of abortion in dairy cattle. Special emphasis was placed on pregnancy losses in the first trimester of pregnancy. *N. caninum* antibodies were analyzed by commercial ELISA in 2,773 pregnant animals (2,022 parous cows and 751 heifers) from 6 herds. The mean seroprevalence of antibodies to *N. caninum* in the herds was 15.1% with variable levels of seroprevalence among herds. No significant effects of *Neospora* positivity and herd were found on the abortion rate before 90 days of pregnancy. Based on the odds ratio, the abortion rate was 4 times higher ($P < 0.0001$) in animals that became pregnant in the warm than in the cool period, and 3.7 times higher ($P < 0.0001$) in parous than in nonparous animals. *Neospora* positivity was the only variable included in the logistic regression model for abortions occurring after 90 days of pregnancy. Seropositivity in an animal increased the probability of abortion by an odds ratio of 18.9 ($P < 0.0001$; 95% confidence interval 12.9 to 27.8), confirming the importance of *N. caninum* infection as a main cause of abortion in our area. Season, parity and herd showed no effect. The results of the present study suggest that chronic *Neospora caninum* infection prior to pregnancy appears not to affect the early fetal period, but does have a significant abortive effect after 90 days of gestation.

In a third study, sera samples were simultaneously screened using two commercial ELISA techniques: CIVTEST (Hipra, Spain) and Herdcheck (IDEXX, USA) in a total of 2435 animals from 5 herds. Important variation in seroprevalence levels were observed among herds, with values from 3.5% and 3.8% to 34.3% and 31.6% with Herdcheck and CIVTEST, respectively. Results from both techniques showed high levels of agreement, mean kappa value of 0.94 (0.82 to 0.96). The results suggested that both ELISA techniques can be interchangeable when analysing seroprevalence of *N. caninum* infection in dairy cattle herds. Only a few samples showed discordant results that could not be discriminated when they were analyzed by IFAT. In the case of animals with doubtful results, a serological follow-up should be advised. The results

confirmed that *N. caninum* infection is important and widespread in dairy cattle from Catalonia and that this infection should be incorporated in the abortion diagnostic protocols.

In a fourth study the objective was to follow-up how the antibody levels change over time during pregnancy in 16 initially seropositive dairy cows and 7 initially seronegative cows, during their pregnancy. Study cows were blood-sampled before artificial insemination (AI), at 45, 90, 120, 150, 180 and 210 days of pregnancy and at parturition, or at the moment of abortion if this occurred. Blood serum samples were analyzed for anti-*N. caninum* antibodies by ELISA (CIVTEST, Hipra, Spain). In all, 3 pregnancies ended in abortion (1 seronegative) and 2 in stillbirths (1 seronegative). All animals seronegative remained as such along the study. The *N. caninum* antibody titres remained well above the cut-off limit for the test used in 14 of the 16 seropositive cows. One animal was negative throughout the whole pregnancy and other animal was negative only at the before AI sampling but seropositive in the rest of samplings. In both, non-aborting and aborting cows, mean values of antibody titres to *N. caninum* rose from 150 days of gestation, being maximum at 210 days and thereafter decreased before parturition. In general, dams that aborted showed maximum antibody titres just before the abortion took place. The consistent pattern of rise in antibody titres observed during pregnancy in most of the cows indicated a reactivation rather than a reinfection of the parasite at mid-gestation. The study results indicate that there is only a minor temporal instability of anti-*N. caninum* antibody reactivity in adult cattle.

Finally, in a fifth study, the serological status of *Neospora* was monitored in animals older than 6 months in a dairy herd with a 3-year history of prevalent *N. caninum* and *N. caninum*-associated abortions. One hundred-twenty-two animals persisted in the herd for the three years. The overall seroprevalence of *N. caninum* in the herd decreased from 31.7% in the first year to 24.8% in the second year and to 19.9% in the third year of the study, while the overall abortion rate decreased from 20.6% in the first year to 5.5% in the second year, and 9.9% in the third. These decreases occurred in response to control measures adopted from the second year onwards, such as culling *Neospora*-seropositive aborted animals and inseminating *Neospora*-seropositive dams with beef bull semen. Of the total number of abortions recorded in seropositive animals, 51% were repeat abortions that occurred in 36.8% of the animals in the herd with a previous history of abortion. The initial seroprevalence of *Neospora* in the 122 animals followed for the 3 years was 18%, increasing to 21.3% in the second and third years. Seroconversion only occurred in 4 animals during the second and third years of the study. In the 122 animals, abortion occurred only in seropositive animals and 61.5% of the total number of abortions in seropositive animals were repeat abortions occurring and in 26.7% of the total number of animals with a previous history of abortion. These results indicate that *Neospora* seropositivity can be very stable through time and *N. caninum* infected cows can show a high rate of repeat abortions. The present data reinforce the idea that annual serological screening for *Neospora* can be an effective and rapid method of detecting *N. caninum* infection, such that control measures can be established at the farm level.

In summary, the results indicate that *N. caninum* infection is a very important cause of abortion in dairy herds from Catalonia, Spain. Based on the present results, adequate control measures will be established in the herds to decrease infection levels and its effects on cattle herds.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Introducción histórica.

El primer caso de infección por *Neospora* se diagnosticó en 1984 en Noruega (Bjerkas y Presthus, 1989), en un perro con paresia de las extremidades y lesiones de carácter inflamatorio en su sistema nervioso central y muscular, producida por un parásito protozoo formador de quistes, morfológicamente parecido a *Toxoplasma gondii* pero serológicamente negativo frente *Toxoplasma*.

En 1988 Dubey y colaboradores (Dubey et al., 1988a) identifican en un grupo de 10 perros en EEUU un parásito similar con idéntica sintomatología y proponen la denominación del parásito en un nuevo género, *Neospora*, y como especie tipo *Neospora caninum*.

Ese mismo año estos autores (Dubey et al., 1988b) consiguen el primer aislamiento del parásito en cultivo celular. La inoculación experimental a perros confirma a *Neospora* como causa de las alteraciones neurológicas, paresia, parálisis y muerte en los perros infectados. También ese año Dubey y colaboradores desarrollan la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos frente *Neospora*. Igualmente ponen a punto técnicas inmunohistoquímicas para la detección del parásito en tejidos. Así se demuestra que el parásito procedente de Noruega es el mismo que el de EEUU. El estudio de casos retrospectivos indica que ya en 1957 el parásito existía en perros en EEUU.

Se sospechaba que un protozoo era el causante de abortos en vacas. O'Toole y Jeffrey en 1987 describen un caso de encefalomiелitis por un esporozoario en un ternero recién nacido en Inglaterra que fue negativo a *Toxoplasma* y *Sarcocystis* (revisado por Paulo et al., 2005).

En 1989 Thilstedt y Dubey reportan la presencia de un protozoo en fetos de ganado lechero abortados en California que reaccionan frente a anticuerpos específicos a *N. caninum*. A partir de 1991 se diagnostica como una de las principales causas de aborto en ganado vacuno en California (Anderson et al., 1991; Barr et al., 1991). En 1993 el parásito es aislado en cerebro de fetos abortados. Estudios posteriores determinaron que el parásito aislado en perros y bovinos pertenece a la misma especie. Desde entonces *Neospora* es reconocido como una causa de abortos también en cabras, ovejas, caballos y ciervos y se han detectado anticuerpos a *N. caninum* en una gran variedad de animales; camellos, búfalos, zorros y gatos entre otros (Dubey, 2003).

Hasta 1998 sólo se habían podido identificar los estadios que forman parte del ciclo asexual o extraintestinal en los hospedadores intermedios (HI). Tras varios intentos frustrados de cerrar el ciclo, por fin se llegó a conocer el hospedador definitivo (HD) de *Neospora* capaz de excretar ooquistes de este parásito que resultó ser el perro (McAllister et al., 1998). Recientemente se ha podido observar que el coyote es también un HD de *N. caninum* (Gondim et al., 2004). Se desconoce si otros cánidos silvestres puedan actuar como HD (Dubey, 2005).

2. Taxonomía.

Taxonómicamente *N. caninum* es un coccidio que se incluye dentro del phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden

Fimeriina y familia Sarcocystidae (al igual que *Toxoplasma*, *Sarcocystis* y *Besnoitia*). (Dubey y Lindsay, 1996).

Neospora caninum se encuentra estrechamente relacionada con otras 3 especies también pertenecientes a la familia Sarcocystidae cuyos ooquistes tienen un tamaño similar: *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* en heces de gatos y *Hammondia heydorni* en heces de perros (Lindsay et al., 1999). Estudios filogenéticos relacionaron inicialmente a *N. caninum* con *T. gondii* (Ellis et al., 1994; Holmdahl et al., 1994), pero no presenta reacciones cruzadas en IFI o ELISA y se pueden observar diferencias en sus estadios parasitarios. También se ha relacionado *N. caninum* con *H. heydorni* (Ellis et al., 1999; Mugridge et al., 1999) planteando un debate sobre la existencia del género *Neospora* (Mehlhorn y Heydorn, 2000; Heydorn y Mehlhorn, 2002). Sin embargo *N. caninum* presenta características biológicas, inmunológicas, morfológicas y moleculares propias que la diferencian de las otras especies (Dubey et al., 2002). Dentro del género *Neospora*, además de *N. caninum*, se ha descubierto otra especie en caballos (*N. hughesi*) que presenta unas pequeñas diferencias a nivel molecular con *N. caninum* (Dubey et al., 2001).

A pesar de existir diversidad biológica y genética entre los aislamientos de *Neospora* en bovinos y caninos, ambos son capaces de causar aborto en bovinos (revisado Dubey et al., 2006).

3. Ciclo parasitario.

La relación con *Toxoplasma* hizo sospechar desde el principio un ciclo similar con hospedadores definitivos carnívoros y hospedadores intermediarios, pues únicamente se habían podido identificar las fases que forman parte del ciclo asexual o extraintestinal en los hospedadores intermediarios (HI): taquizoitos y quistes con bradizoitos en su interior. El ciclo de vida presenta tres fases: taquizoitos, bradizoitos en quistes y ooquistes. Los taquizoitos y los quistes son intracelulares y se desarrollan en los HI.

3.1. Taquizoitos.

La estructura de los taquizoitos es idéntica a la de otros Apicomplexa, si bien pueden diferenciarse morfológicamente de *T. gondii* por microscopía electrónica (ME) por su gran número de roptrias, de 8 a 18 y de micronemas, hasta 150, que en los otros géneros son limitados. Además en *Neospora* hay muy pocos gránulos de amilopectina (PAS +) que son muy numerosos en *T. gondii* (Figura 1).

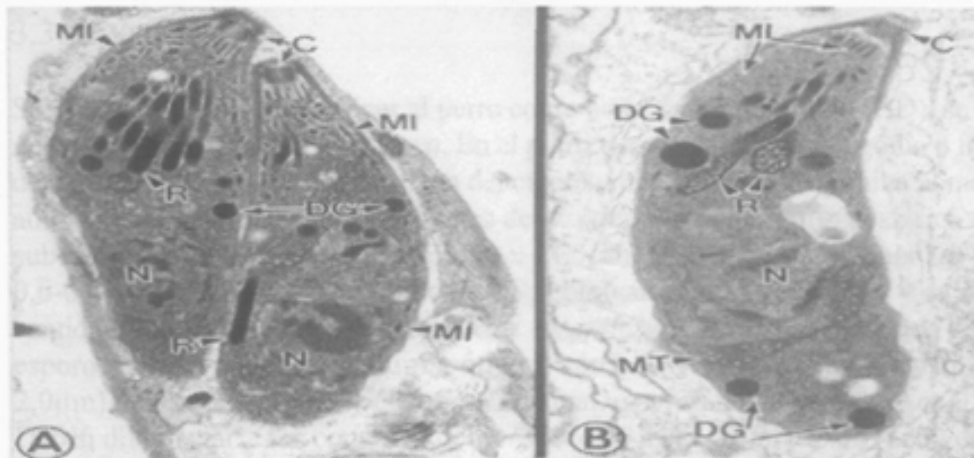
Los taquizoitos tienen un diámetro de $6 \times 2 \mu\text{m}$ aproximadamente, aparecen intracelularmente. Los taquizoitos se dividen en 2 zoitos por endodiogenia. Miden aproximadamente $6 \times 2 \mu\text{m}$, y presentan una forma piriforme o en banana. Se sitúan en el citoplasma de células nerviosas (Schwann, neuronas) preferentemente, pero pueden encontrarse en células tan diversas como macrófagos, fibroblastos, células epiteliales, células renales, hepatocitos. El taquizoito es la fase de desarrollo más rápido y la más patógena, causando lisis celular por división activa dentro de la célula hospedadora (Dubey y Lindsay, 1996; Lindsay y Dubey 2000) y pasa vía transplacentaria al feto en las hembras gestantes.

El cultivo in vitro de los taquizoitos ha permitido el estudio de los mecanismos de reconocimiento, adhesión a la célula e invasión celular con formación de una vacuola parasitofora intracitoplasmática en donde los taquizoitos se multiplican por

endodiogenia y tras la ruptura celular se inicia nuevamente el proceso de invasión celular (Hemphill et al., 1996, Hemphill, 1999).

Por acción del sistema inmune del hospedador los taquizotos se transforman en bradizoitos, los cuales se dividen lentamente hasta formar quistes en el tejido nervioso (Wouda, 2000). Los mecanismos que llevan a la transformación de los taquizoitos en bradizoitos y las interacciones parásito-hospedador se han estudiado in vitro (Weiss et al., 1999; Hemphill et al., 2004) pero se sabe poco de ellos.

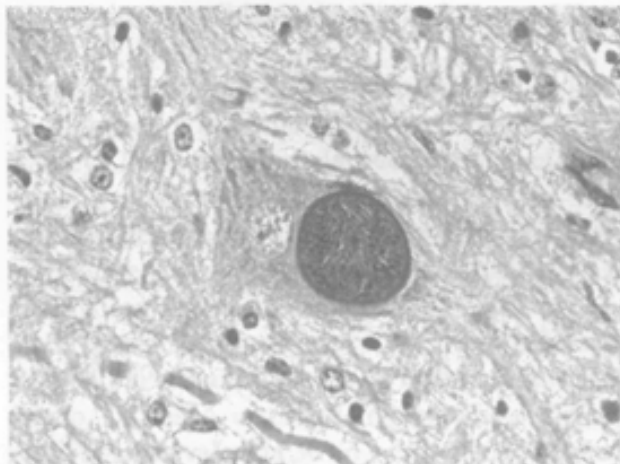
Figura 1. Taquizoito *Neospora*(A) /*Toxoplasma* (B). Foto generosamente cedida por J.P Dubey (Beltsville, MD, USA).



3.2. Bradizoitos y quistes.

Los bradizoitos están contenidos en el interior de quistes intracelulares, contienen las mismas organelas que los taquizoitos, aunque en los bradizoitos el número de roptrias es menor, tienen más gránulos de amilopectina (Speer y Dubey, 1989; Jardine, 1996) y su crecimiento es lento.

(Figura 2. Quiste con Bradizoitos). Foto generosamente cedida por J.P Dubey (Beltsville, MD, USA).



Los quistes tienen forma ovalada a redondeada con una longitud de hasta 107 μm , se caracterizan y diferencian de otros apicomplexa por poseer una pared quística muy gruesa, hasta 4 μm de grosor y en su interior contienen numerosos bradizoitos de 7-8 x 2 μm (Figura 2). Se localizan en el tejido nervioso central incluyendo retina y también se han observado quistes en nervios periféricos de un equino y en el músculo ocular de un potro infectado congénitamente. Aunque no se han logrado observar quistes en tejido muscular tras infección experimental (Dubey et al., 2002) recientemente se han descrito quistes de pared muy delgada con 0.3-1.0 μm de grosor en músculo de ganado y perro tras infección natural (Peters et al., 2001; Dubey, 2003).

3.3. Ooquistes.

Sólo hasta 1998 tras determinar al perro como hospedador definitivo (HD), se confirmó la naturaleza coccidiana de *Neospora*. En el perro tiene lugar la gametogonia o fase sexual del ciclo que da lugar a la formación del cigoto u ooquiste que se elimina al medio ambiente no esporulado. Los ooquistes de *N. caninum* tienen forma esférica o subsférica y su tamaño es de 11,7 μm x 11,3 μm . La pared es lisa, tiene un grosor de 0,6-0,8 μm y no contiene el micropilo. Se eliminan en muy pocos días y en muy poca cantidad, esporulan en el medio ambiente en unas 24 horas con la presencia de dos esporocistos elipsoidales (8,4 μm x 6,1 μm) con cuatro esporozoitos cada uno (6,5 μm x 2,0 μm) de forma alargada y el cuerpo residual esporoquístico (Lindsay et al., 1999). Deben diferenciarse los ooquistes de *Neospora* de los de *H. heydorni* (Schares et al., 2005).

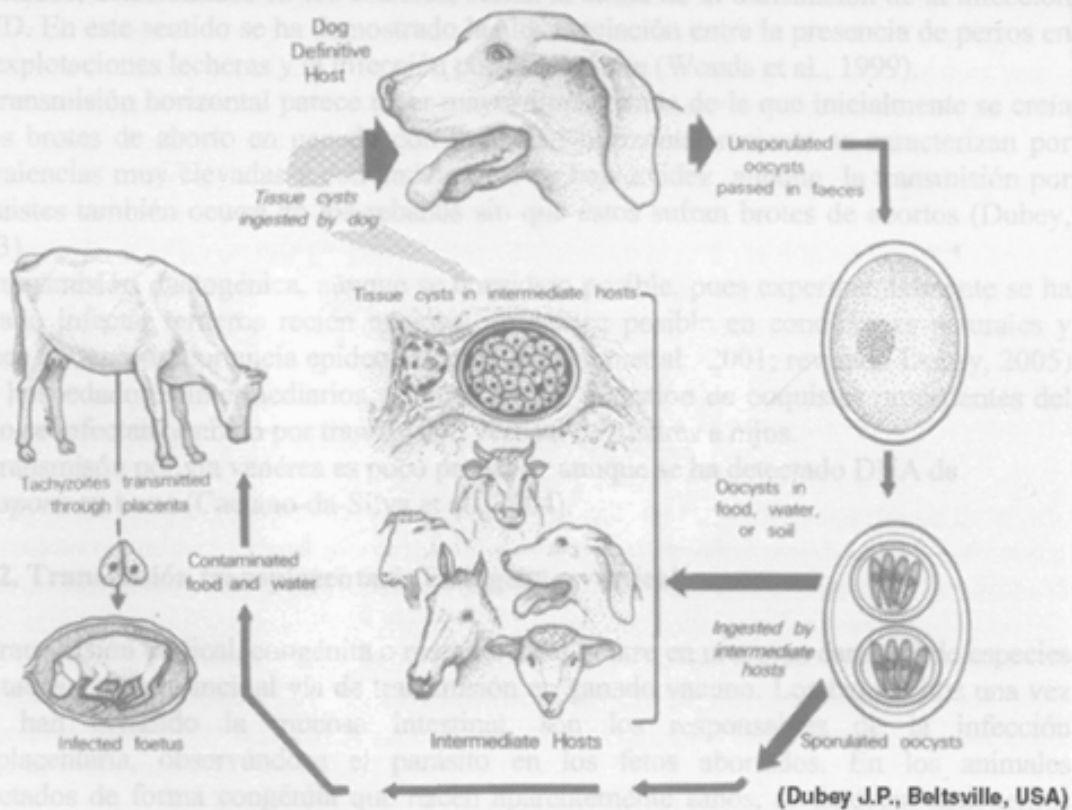
El perro no sólo actúa como IID sino también como HI y experimentalmente se ha comprobado su infección tras ingerir tejidos de ganado (Dijkstra et al., 2001) y de animales silvestres naturalmente infectados (Gondim et al., 2005), pero no tras ingerir tejidos de fetos abortados (Bergeron et al., 2001). Los casos de detección de ooquistes en heces en perros con infección natural son escasos (Basso et al., 2001). También pueden actuar como HI muchas otras especies en las que se ha encontrado los estadios extraintestinales, bien taquizoitos o quistes con bradizoitos de *N. caninum* tales como en tejidos de ganado vacuno, equinos, ovino, caprino y ciervos. Además se ha detectado presencia de anticuerpos de *N. caninum* en muy diversos animales: mapaches, ciervos, búfalos de agua, camellos, gatos, etc ... indicando contacto de forma natural con el parásito y posiblemente actuando como HI en un ciclo silvático (Dubey, 2003).

Aún se desconocen algunos aspectos del ciclo completo de *N. caninum* como la localización o la estructura de los estadios enteroepiteliales en el perro (Lindsay y Dubey, 2000) así como la frecuencia de eliminación de los ooquistes y su supervivencia en el medio externo (Dubey, 2005). También se desconocen aspectos sobre el desarrollo y distribución de *N. caninum* en los tejidos de animales infectados naturalmente y se sabe poco de la infectividad de los quistes y taquizoitos en los carnívoros después de su ingestión natural.

A diferencia de *Toxoplasma*, *Neospora* no ha sido descrito en la especie humana (Nam et al., 1998; Petersen et al., 1999; Dubey, 2003), aunque se precisa más investigación en este punto. De hecho, un estudio reciente ha evidenciado presencia a anticuerpos en enfermos de SIDA (prevalencia 38%) y en enfermos con alteraciones neurológicas (prevalencia

18%). En este estudio la seropositividad a *N. caninum* fue confirmada mediante de inmunoblotting (Lobato et al., 2006).

Figura 3. (Esquema ciclo)



3.4. Transmisión.

La forma más frecuente de transmisión de *Neospora* en la naturaleza es la transmisión transplacentaria vertical o endógena pero también se da transmisión transplacentaria exógena, horizontal o postnatal (Trees y Williams, 2005). La vía vertical permite el mantenimiento de la infección en el rebaño en varias generaciones (Björkman et al., 1996; Wouda et al., 1998a) pero no es 100% efectiva. Por lo tanto, para que la infección se mantenga indefinidamente en un rebaño se debe dar transmisión horizontal. No se ha demostrado transmisión de vaca a vaca (Anderson et al., 1997).

3.4.1. Transmisión transplacentaria exógena, horizontal o postnatal.

La transmisión horizontal o post-natal de la infección es posible por la ingestión de ooquistes eliminados en las heces del HD-principalmente el perro, que contaminarían el alimento (pastos y forrajes y piensos almacenados) y el agua de bebida. Por el momento se desconoce la importancia relativa del pasto contaminado comparado con el forraje y los piensos almacenado, de los cánidos silvestres (zorros, coyotes y dingos) en relación

con los perros domésticos, así como las de las diferentes aptitudes (de compañía, de pastor, de caza) y razas de perros.

No obstante, también la estrecha convivencia del perro con el ganado favorecería la transmisión horizontal entre el perro y los bóvidos. Por una parte, la cama y los alimentos almacenados (forraje y concentrados) contaminados con ooquistes eliminados en las heces de los perros infectados podrían ser una fuente de infección para las vacas, y por otro el acceso de los perros a las placentas, fetos abortados y restos de animales muertos infectados, abandonados en los establos, serían la causa de la transmisión de la infección al HD. En este sentido se ha demostrado la alta asociación entre la presencia de perros en las explotaciones lecheras y la infección por *N. caninum* (Wouda et al., 1999).

La transmisión horizontal parece tener mayor importancia de la que inicialmente se creía y los brotes de aborto en ganado con infección horizontal reciente se caracterizan por prevalencias muy elevadas y con anticuerpos de baja avidéz aunque la transmisión por ooquistes también ocurre en los rebaños sin que éstos sufran brotes de abortos (Dubey, 2003).

La transmisión lactogénica, aunque se considera posible, pues experimentalmente se ha logrado infectar terneros recién nacidos, no parece posible en condiciones naturales y parece no tener importancia epidemiológica (Davison et al., 2001; revisado Dubey, 2005). Los hospedadores intermediarios, además de por ingestión de ooquistes procedentes del perro se infectan también por transmisión vertical de madres a hijos.

La transmisión por vía venérea es poco probable aunque se ha detectado DNA de *Neospora* en toros (Caetano-da-Silva et al., 2004).

3.4.2. Transmisión transplacentaria endógena o vertical.

La transmisión vertical, congénita o materno-fetal ocurre en una gran cantidad de especies afectadas y es la principal vía de transmisión en ganado vacuno. Los taquizoitos una vez que han invadido la mucosa intestinal, son los responsables de la infección trasplacentaria, observándose el parásito en los fetos abortados. En los animales infectados de forma congénita que nacen aparentemente sanos, se detectan anticuerpos frente a *Neospora* antes de la toma de calostro (Dubey, 1999b). Los abortos y la infección en general pueden repetirse en un mismo animal y las hembras infectadas serán positivas durante toda la vida, teniendo más probabilidades de aborto al llegar a adultas, contribuyendo al mantenimiento de la infección en los rebaños (Hietala y Thummond, 1999; Davison et al., 1999). La vía trasplacentaria es altamente efectiva con transmisión madre-feto del 80% o más (revisado Wouda, 2000) y puede actuar en el mantenimiento de la infección en un rebaño incluso sin la participación de un HD que contamine el medio con ooquistes del parásito (McAllister et al., 1996), pero no es 100% efectiva como lo indican los estudios de varias generaciones de madres e hijas.

No se ha demostrado transmisión por transferencia de embriones por lo cual esta última se recomienda para el control de la transmisión vertical. (Baillargeon et al., 2001; Landmann et al., 2002; Bielanski et al., 2002).

3.5. Ciclo silvático.

Diversos estudios han evidenciado la presencia de anticuerpos y por tanto contacto con *N. caninum* en una gran variedad de especies silvestres como en ciervo de cola negra y blanca, ciervo rojo, corzo, búfalos de agua, búfalo africano, cebras, camellos, rinocerontes, (revisado Dubey, 2003; Ferroglio et al., 2003, Soldati et al., 2004) en alce (Gondim et al., 2004), en bisonte americano y caribou (Dubey y Thulliez, 2005) así

como también en especies de zoológico (Sedlak and Bartova, 2006) aunque de las cuales sólo se ha logrado confirmar al ciervo de cola blanca como huésped intermediario (revisado Gondim, 2006) y se ha aislado de búfalos de agua y ovejas (Dubey, 2005).

También se ha detectado presencia de anticuerpos en una variedad de carnívoros silvestres; coyotes (Lindsay et al., 1996), dingos (Barber et al., 1997), zorros rojos y grises (Barling et al., 2000; Schares et al., 2001) sugiriendo un papel de los cánidos silvestres en la epidemiología de la neosporosis. Por otro lado también se ha indicado que la exposición de coyotes o zorros grises es un factor de riesgo en la infección (Barling et al., 2000). Recientemente se ha detectado eliminación de ooquistes de *N. caninum* por el coyote (Gondim et al., 2004) y se sospecha que otros carnívoros silvestres como el zorro rojo puedan actuar como HD manteniendo un ciclo silvático de la infección (Almería et al., 2002). En España, el zorro es un hospedador intermediario natural en el ciclo de *Neospora* (Almería et al., 2002).

El papel de cada una de estas especies hospedadores en el ciclo biológico del parásito y su importancia en relación con la transmisión de la infección no está totalmente aclarado pero al tomar medidas de control en las granjas deben considerarse también este tipo de animales.

4. Distribución y prevalencia en ganado vacuno.

La infección por *N. caninum* es reconocida como una de las principales causas de aborto en ganado vacuno en todo el mundo. Su distribución es mundial con descripción de casos en todos los continentes incluyendo Australia, Nueva Zelanda, Asia, Europa y América del Norte y de del Sur (revisión Dubey, 2003). Hay diferencias en las prevalencias no sólo según el país que se esté estudiando sino también la región donde esté ubicado el/los rebaños analizados lo cual hace que cada país y /o región sean diferentes los factores de riesgo y el impacto económico de la infección por *Neospora* en los diversos rebaños (Caetano-da-silva et al., 2004).

Varios estudios han indicado las diferencias entre las prevalencias de infección en esta especie y han permitido observar índices de aborto asociados a infección por *Neospora* que varían del 12% en Alemania al 45 % en U.S.A., causando importantes pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas bovinas (revisado Dubey, 1999a; Dubey, 2003). En la actualidad se considera la causa más importante de abortos en ganado vacuno en California con más del 87% de vacas seropositivas en algunos rebaños (revisado por Dubey, 2003). En Holanda la infección por *N. caninum* se encuentra ampliamente diseminada con presencia de animales seropositivos en el 78% de los rebaños estudiados (Wouda, 2000).

En ganado de carne *N. caninum* también provoca abortos y mortalidad neonatal pero comparativamente se sabe poco de la infección y de las causas del aborto debido a la dificultad de obtener los fetos abortados (Dubey, 2005). Aunque, eliminar En general, los rebaños de leche tienen mayores prevalencias que los rebaños de carne, con diferencias significativas en España pero no en otros países europeos (Alemania, Holanda, Suecia) (Bartels et al., 2006; Caetano-da-Silva et al., 2006).

5. Patogenia en ganado vacuno.

La infección en ganado vacuno puede ocurrir transplacentariamente o tras ingestión de ooquistes esporulados. Se desconocen aspectos de la patogénesis de la infección en la vacas después de infección oral con ooquistes (Dubey, 2003).

Cuando esta ingestión ocurre durante la gestación, el parásito invade las células del útero grávido provocando brotes de aborto. Por lo tanto en estos casos la parasitemia en la madre trae como consecuencia la infección fetal que también ocurre en ganado infectado crónicamente por *Neospora* antes de la gestación.

Los abortos y la infección en general pueden repetirse en un mismo animal, aunque en una menor proporción (Dubey, 2003). Además, las hembras infectadas serán seropositivas durante toda la vida, teniendo más probabilidades de aborto al llegar a adultas, y contribuyendo al mantenimiento de la infección, sobre todo en los rebaños (Davison et al., 1999; Anderson et al., 1995; Hietala y Thurmond, 1999).

Al analizar como se produce la infección y muerte fetal surgen varias posibles hipótesis ligadas al período de gestación en el cual se da la transmisión de la madre al feto (como consecuencia de la reactivación de una infección latente) y a la respuesta inmune materna. A su vez la manifestación de la infección depende de la edad fetal y posiblemente del grado y duración de la parasitemia y a las características del aislado infectante (Innes et al., 2000; Innes et al., 2002; Buxton et al., 2002).

El complejo proceso de invasión celular entre los apicomplexa es similar e incluye receptores de superficie y proteínas de micronemas, roptrias y gránulos densos que mediaran la adhesión a la superficie celular y la formación de vacuolas parasitóforas intracelulares y su posterior maduración (Naguleswaran et al., 2003).

Los detalles del proceso de invasión celular pueden ayudar a explicar el porqué algunas células son más susceptibles que otras a la invasión por *Neospora* y porqué algunas especies como los caninos y el ganado vacuno lechero son más susceptibles a la infección (Buxton et al., 2002).

5.1. Invasión celular.

El ataque inicial del parásito ocurre sin ninguna orientación sobre el plasmalema de la célula huésped. Posteriormente el taquizoito es reorientado y su porción apical se dirige hacia la célula uniéndose a ella. Las organelas empiezan a descargar su contenido en la vacuola parasitófora en formación. La membrana parasitófora vacuolar (PVM) se forma por inversión del plasmalema del huésped sobre el parásito hasta que se establece una vacuola parasitófora con organelas asociadas a la PVM. (Buxton et al., 2002).

El mayor daño patógeno parece ser debido a la rápida multiplicación de los taquizoitos en el interior de las células, fundamentalmente en células nerviosas con lisis celular y focos de necrosis. Alrededor de estas áreas se produce una fuerte reacción inflamatoria, fundamentalmente de células mononucleares la cual se produce incluso con escasa presencia del parásito. Se desconoce la existencia de toxinas o sustancias solubles eliminadas por el parásito.

Por su parte los quistes tisulares no parecen causar gran daño tisular, no apareciendo respuesta inflamatoria por parte del hospedador, aunque en ocasiones tras la ruptura de un quiste se presenta un granuloma que rodea el tejido quístico degenerado y a los bradizoitos (Dubey, 2003).

En inoculación experimental se ha observado que los taquizoitos de *Neospora* son infectivos vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular e incluso por vía oral a pesar de

ser sensibles a las enzimas gástricas. Por su parte los bradizoitos resisten la acción del ácido clorhídrico y de la pepsina.

La localización del parásito y las lesiones inflamatorias determinarán el curso clínico en los animales afectados.

5.2. Patogenia del aborto.

Para intentar explicar la presencia de abortos debidos a *Neospora* se han de buscar sus causas tanto en las lesiones que causa directamente el parásito en la placenta y en el feto e impiden su supervivencia, así como por la liberación de prostaglandinas que provocan luteólisis y posterior aborto o también por la liberación de cytoquinas pro-inflamatorias que provocan la expulsión fetal. Todos los anteriores relacionados entre sí, cobran mayor o menor importancia según el período de gestación en que ocurran (Dubey et al., 2006).

La madurez del sistema inmune fetal se da progresivamente durante la gestación. A partir de los 100 a 150 días de gestación el feto es capaz de empezar a desarrollar una respuesta inmune que se hace más competente después de los 150 días de gestación y el feto es capaz de reconocer y responder a varios patógenos.

Estudios en hembras gestantes han indicado una alta susceptibilidad del feto inmaduro a la multiplicación de *N. caninum* estando altamente relacionado la presencia de aborto con el período de la gestación (Quintanilla- Gozalo et al., 2000).

A partir del segundo tercio de gestación y a pesar de que el feto desarrolla una respuesta inmune, no es suficiente pues durante este período se presentan la mayoría de abortos asociados a *Neospora* y los que llegan al tercer trimestre de gestación nacen vivos pero infectados (Pereira-Bueno et al., 2000).

Tanto en infección experimental como en infección natural la invasión de *Neospora* en el útero y su multiplicación intracelular provoca focos de necrosis en los tejidos de la madre y el feto en la interfase maternofetal y da inicio a una respuesta inflamatoria. Desde aquí la lesión se extiende al corioalantoides (membrana placentaria del feto) entre los cotiledones aunque se desconoce si la mayoría de lesiones son causa directa del parásito o de la respuesta inmune materna y fetal (Buxton et al., 2002).

Tan letal como las lesiones en la placenta y la inflamación en los tejidos de la madre y el feto es el paso de *Neospora* a la circulación fetal e invasión de los tejidos fetales, principalmente del sistema nervioso central, donde inicialmente se localiza alrededor de los vasos sanguíneos causando destrucción del neuropilo en los fetos menos desarrollados. En fetos más desarrollados que ya pueden defenderse del parásito, la multiplicación es más restringida y la necrosis se limita a focos con reacción inflamatoria intensa. También se puede presentar una meningitis leve y lesión de órganos fetales como músculo esquelético, corazón, pulmón, hígado (Buxton et al., 2002).

5.3. Reactivación de una infección latente.

Como ya se ha indicado, la principal vía de transmisión de la infección por *N. caninum* es la transplacentaria y el aborto afecta más a los animales seropositivos, especialmente a aquellos que presentan títulos más elevados hacia el segundo tercio de la gestación.

Todo lo anterior sugiere que los abortos ocurren como consecuencia de la reactivación de una infección latente (Buxton et al., 2002; Dubey, 2005) pero se desconoce como actúa este mecanismo de reactivación en el ganado aunque posiblemente esté relacionado con la disminución en la proliferación de la inmunidad mediada por células

(CM1) hacia la mitad de la gestación (Innes et al., 2001; Innes et al., 2002; Innes et al., 2005).

La reactivación también podría ocurrir durante la gestación debido a una inmunosupresión como consecuencia del efecto inhibitorio de la progesterona sobre la producción del óxido nítrico (NO) así como sobre el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y sobre la activación de las células asesinas (NK) (Collantes, 2003).

Además es raro el aislamiento de *Neospora* de tejidos de vacas adultas con excepción de un aislamiento en el cerebro de una vaca (Sawada et al., 2000) y los aislamientos de quistes en músculo esquelético (Peters et al., 2001).

Similarmente en los pacientes infectados con *T. gondii* la alteración en el sistema inmune provoca la reactivación de la infección y sintomatología aguda y la recrudescencia de la infección coincide con la disminución de la respuesta de células T y de TNF- α en pacientes HIV infectados persistentemente (revisado por Innes et al., 2005).

El papel de las hormonas en la reactivación no es claro aunque se conoce la tendencia de la progesterona hacia la respuesta de células tipo Th2 y los niveles de progesterona en vacas gestantes se elevan desde el inicio hacia la mitad de la gestación paralelamente con la disminución de la proliferación celular y del TNF- α que puede favorecer la recrudescencia de *Neospora* en animales infectados crónicamente (Innes et al., 2005) y coincidiendo además con los niveles más elevados de anticuerpos. Sin embargo no se ha aclarado la relación ni en vacas gestantes infectadas naturalmente ni en roedores tras la infección experimental (Guy et al., 2001). Aunque se plantea que las alteraciones en los niveles hormonales pueden reactivar los quistes de *N. caninum*, este mecanismo aún no se ha demostrado en la neosporosis (Dubey, 2003).

6. Factores de riesgo asociados a la infección por *Neospora*.

La manifestación de la infección por *Neospora* parece presentar un carácter multifactorial o multicausal y se mencionan posibles factores como la presencia de otros agentes infecciosos, las variaciones en la inmunidad de los animales, la presencia/ausencia del HD o de un vector que contribuya a la diseminación del parásito.

La seropositividad a *Neospora* está asociada al tipo de rebaño (leche/carne), la edad de los animales, la raza de los animales, el país y la región de procedencia así como al número de animales y factores propios del rebaño.

6.1. Aptitud y manejo del rebaño.

Los estudios en ganado de carne suelen presentar prevalencias más bajas que en los rebaños de leche (Quintanilla-Gozalo et al., 1999; Moore et al., 2002; Koiwai et al., 2005; Bartels et al., 2006). Las tasas de prevalencia suelen ser más elevadas en las granjas de leche que en las de carne pues el manejo intensivo en las granjas lecheras y las condiciones de hacinamiento favorecen la presencia de abortos (Sanderson et al., 2000). En España, los rebaños lecheros presentan seroprevalencias significativamente más elevadas que los rebaños de carne, básicamente debido a las diferencias en el manejo pues en España el ganado de carne está ubicado en las montañas y con muy bajas densidades comparada con otros países europeos que hacen un manejo intensivo de sus rebaños de carne como Alemania y Holanda (Bartels et al., 2006). En general, las causas de aborto en ganado de carne son aún más desconocidas que en ganado de leche debido a la dificultad

de obtener tejidos de los abortos (Dubey, 2005). Sin embargo, las lesiones en los tejidos fetales procedentes de ganado de carne son menos severas comparadas con los tejidos procedentes de fetos de ganado de leche (De Meerscham et al., 2002).

6.2. Raza.

La mayoría de estudios no encuentran asociación con la raza (Caetano-da-Silva et al., 2004) aunque en Suecia se ha observado una asociación significativa entre la infección con *Neospora* y algunas razas lechera (Bartels et al., 2006).

También se ha observado que la inseminación de vacas lecheras seropositivas con vacuno de carne, especialmente de la raza Limousin, decrece el riesgo de aborto en estos animales (López-Gatius et al., 2005a).

6.3. Edad.

El aborto se puede presentar en vacas de cualquier edad (Dubey, 2003) En algunos rebaños se ha observado incremento de la seroprevalencia asociado a la edad lo cual indica la existencia de transmisión horizontal y está asociado a un mayor contacto de los animales con *Neospora* a lo largo de su vida (McAllister et al., 1996). En un reciente estudio europeo se observó aumento de la prevalencia asociado a la edad en España posiblemente debido a que la tasa de reemplazo es menor e implica mayor exposición al parásito, mientras que en Suecia se observó una relación inversa entre edad y seropositividad (Bartels et al., 2006). En los rebaños donde predomina la transmisión congénita no se observan diferencias en la seroprevalencia entre los diferentes grupos de edades en el rebaño. Parece ser que la transmisión vertical es más eficiente en los animales jóvenes y disminuye con la edad (McAllister et al., 2000; Dijkstra et al., 2003; Dubey, 2003). El análisis de la seroprevalencia según la edad proporciona valiosa información sobre la vía de transmisión de la infección en un rebaño (revisado Dubey y Schares 2006)

6.4. País o región de procedencia.

Las prevalencias de infección por *Neospora* en el ganado varían según el país y la región estudiada (Dubey, 2005) observándose mayor probabilidad de infección por *Neospora* en zonas con mayor densidad de ganado vacuno comparada con otras regiones (Bartels et al., 2006) y las prevalencias varían ampliamente entre los diferentes países (Buxton et al., 2002).

6.4.1. *Neospora* en España

Tras la descripción de los primeros casos de aborto en ganado vacuno en España (Barberán et al., 1997; Fondevila et al., 1998) los estudios de seroprevalencia en diferentes regiones han puesto de manifiesto la amplia difusión de la infección en España. El primer trabajo sobre presencia de anticuerpos de *N. caninum* se llevó a cabo en una granja de vacas de leche en Galicia (Quintanilla-Gozalo et al., 1996), donde se observó una relación entre la seroprevalencia y los abortos en un 72% de los casos. En la región Centro-Costa Asturiana un 30% de los animales estudiados fueron seropositivos y la presencia del parásito se considera endémica en la zona (Mainer-Jaime et al., 1999). Además se observó la asociación significativa entre un mayor número de perros en las explotaciones y una prevalencia en vacuno superior al 10% (Berzal et al., 1998). En un

estudio de abortos de diferentes regiones, incluyendo las anteriores, junto a Navarra y el País Vasco, se observó que entre el 32% al 57% de los fetos estaban infectados por *N. caninum* y entre el 33% y 58 % de los rebaños afectados (Gonzalez et al., 1999; Pereira-Bueno et al., 2003). Todos estos datos indican la importancia de la infección por *N. caninum* en el ganado vacuno de nuestro país.

El más reciente estudio europeo de neosporosis revela prevalencias de *Neospora* del 63% (intervalo de confianza al 95%: 57%-69%) en ganado lechero en España, siendo la prevalencia más elevada comparada con países europeos tales como Holanda, Alemania o Suecia analizados en el mismo estudio. También la prevalencia animal real fue la más elevada (16,2%, intervalo de confianza 95%: 14,9%-17,5%) con elevadas variaciones intrarebaños (Bartels et al., 2006).

6.5. Otros factores.

La presencia de múltiples y diversos factores parece estar asociada a la infección por *Neospora* tales como la infección por el virus BVD (Diarrea Viral Bovina) (Björkman et al., 2000).

El clima, específicamente las altas temperaturas han demostrado tener efectos negativos en la fertilidad (Wolfenson et al., 2000), pero son escasos los estudios sobre los efectos del clima en el feto. Se ha podido determinar que la estación de gestación está asociada a la pérdida fetal antes de los 90 días de gestación (López-Gatius et al., 2004) y estudios previos en Alemania e Italia observaron relación entre factores climáticos como periodos de lluvias y la temperatura que pueden estar relacionados con la infección y abortos por *Neospora* y también se podrían asociar al desarrollo de los ooquistes en el medio ambiente (Bartels et al., 2006). En este mismo aspecto, en zonas áridas de España hay una clara relación de abortos con la presencia de lluvias debido a las consecuencias que de éstas se derivan como son los cambios en la alimentación debidos a la humedad y deterioro del lugar de reposo de los animales (López-Gatius et al., 2005b).

7. Aspectos inmunológicos de la infección en ganado vacuno.

7.1. Respuesta inmune celular.

Los mecanismos de transmisión congénita y aborto son aún poco conocidos pero se ha observado que el sistema inmune está relacionado con ambos y como ocurre con otros protozoos intracelulares en la respuesta protectora predominará la respuesta Th1 (Quinn et al., 2002).

Neospora caninum es un patógeno intracelular obligado y la respuesta inmune mediada por células (CMI) tiene un papel importante en la protección celular pues estimula una respuesta tipo Th1 con producción de IL-2, IFN- γ , IL-12, TNF- α , producción de NO que son letales para el parásito (Innes et al., 2002) y gran actividad de linfocitos T CD4+ (Andrianarivo et al., 2001).

La respuesta inmune protectora en neosporosis está determinada por las citoquinas pro-inflamatorias y por la respuesta tipo Th1. La protección del IFN- γ se ha observado en vacas con infección natural donde los niveles elevados de IFN- γ se han relacionado con inhibición de la transmisión congénita y por el contrario en fetos con bajos niveles de IFN- γ se han observado las lesiones más severas tras infección experimental (Williams et al., 2000; Andrianarivo et al., 2001). Aunque en algunos casos un exceso de IFN- γ en los

fetos, probablemente como respuesta a una elevada infección en el feto, también se ha asociado a aborto (Almería et al., 2004).

Además experimentalmente se ha observado inhibición del parásito en células tratadas con IFN- γ e inhibición de la multiplicación de los taquizoitos tratados conjuntamente con TNF- α del cual se han observado variaciones en su expresión tras la infección experimental con bajos (Williams et al., 2000) y altos niveles (Almería et al., 2003).

La proliferación de células antígeno-específicas se ha observado tanto en animales experimental como naturalmente infectados y las células CD4+T de ganado infectado fueron capaces de destruir a células análogas infectadas (Innes et al., 2005).

La respuesta CMI está relacionada con la recrudescencia del parásito y el período de gestación siendo más intensa al inicio y al final y más baja en el segundo tercio (Innes et al., 2001; Innes et al., 2002; Almería et al., 2003).

7.2. Respuesta inmune humoral.

Los anticuerpos indican el contacto del sistema inmune con el antígeno y los niveles elevados de anticuerpos reflejan una actividad y multiplicación en este caso de *Neospora* en el hospedador. Los altos niveles de anticuerpos en la gestación se han relacionado con el aborto por lo cual su estudio es de gran utilidad tanto en el diagnóstico como en análisis epidemiológicos. Es poco lo que se conoce sobre la eficacia protectora de los anticuerpos, sin embargo, previenen la infección de los taquizoitos en las células del hospedador (Innes et al., 2002). A diferencia de *T. gondii*, que estimula una respuesta inmune protectora tras un primer contacto con el parásito y la aparición de anticuerpos protectores, en *Neospora* no se desarrolla tal respuesta protectora o lo hace en menor medida (Williams et al., 2003).

El desarrollo de una inmunidad protectora no es claro. Estudios en infección experimental en hembras gestantes han permitido observar que tras la infección inicial y subsecuente aborto se desarrolla una respuesta inmune protectora que reduce el riesgo de abortos posteriores (McAllister et al., 2000) y tras la exposición a *Neospora* los rebaños con infección crónica son menos susceptibles de abortar que los no infectados (McAllister et al., 2000). Sin embargo, esta protección es más eficiente en hembras que se reinfectan con ooquistes que en aquellas hembras en las se reactiva la infección (revisado Dubey, 2003) y la protección no es suficiente para evitar el paso de la infección congénitamente (Innes et al., 2002).

La respuesta inmune humoral tanto en vacas como en fetos parece ser predominantemente de tipo IgG2 (Andrianarivo et al., 2001) y los niveles de anticuerpos en hembras gestantes fluctúan, elevándose hacia la mitad de la gestación y están ligados a la presencia de abortos en este período (Guy et al., 2001; Quintanilla-Gozalo et al., 2000).

La respuesta humoral del feto bovino no proviene de la madre pues no hay transferencia de anticuerpos a *Neospora* vía transplacentaria. En fetos infectados se han detectado anticuerpos Ig M y Ig G desde el sexto mes de gestación (Bartley et al., 2004) que continúan hasta el último tercio de gestación (Andrianarivo et al., 2001).

7.3. Respuesta inmune en hembras gestantes

La respuesta inmune que tiene lugar durante la gestación, momento en el que se produce la transmisión al feto causando abortos o transmisión vertical, es prácticamente desconocida. En la hembra gestante la respuesta inmune puede alterar su capacidad de controlar la infección y por otro lado la respuesta inmune que la madre genera contra la

infección puede perjudicar la gestación (Innes et al., 2005). De hecho en la gestación parece existir una tendencia a que la respuesta inmune sea de tipo Th2, que se ha visto asociada a una mejor implantación embrionaria y mantenimiento de la gestación en las etapas tempranas, mediante la supresión de respuestas locales de tipo inflamatorio (Wegman et al., 1993; Chaouat et al., 2002). Sin embargo, esta tendencia hacia respuestas de tipo Th2 que protege al feto, puede a su vez favorecer las infecciones por protozoos y la existencia de transmisión vertical al feto (Long y Baszler, 2000; Almería et al., 2003).

El sistema inmune, regulado a través de las citoquinas, juega un papel fundamental durante la gestación, un complejo proceso en el que la madre ha de dar soporte a un elemento con diferente dotación genética. La inmunidad mediada por células, que incluye citoquinas pro-inflamatorias como el IFN- γ (respuesta Th1) protege frente a *N. caninum*. Aunque hay un claro balance Th1/Th2 durante la gestación (Michie, 1998; Kidd, 2003;), se ha sugerido que hay una tendencia hacia la inmunidad humoral (respuesta Th2), asociado a una implantación con éxito del feto y al mantenimiento de la gestación (Mellor and Munn, 2000; Druckmann and Druckmann, 2005), de manera que un exceso de respuesta Th1 puede inducir pérdidas de gestación (Ragupathy, 1997). Por lo tanto, se acepta que el aborto debido a neosporosis, entre otras causas, puede ser la manifestación de un cambio de la respuesta beneficiosa tipo Th2 hacia un exceso de inmuno-respuesta tipo Th1 durante el periodo de gestación sensible a *N. caninum* (Quinn et al., 2002; Innes et al., 2002; Innes et al., 2005).

Durante la gestación los altos niveles de progesterona promueven la proliferación de las citoquinas Th2 (IL 4, IL5, IL 10) así como la inhibición de producción de NO por parte del TNF- α e inhibe la actividad de las células NK (Quinn et al., 2002). En la placenta *Neospora* actúa potenciando el papel de las citoquinas tipo Th2 (IL-10, IL-4, TGF- β) (Almería et al., 2003; Innes et al., 2005) que han de contrarrestar la respuesta inflamatoria inducida por las citoquinas Th1.

La respuesta tipo Th1 es protectora contra patógenos intracelulares incluyendo *Neospora* pero en la hembra gestante por el contrario actuará en deterioro de la preñez provocando la muerte fetal (Innes et al., 2002). La respuesta Th1 incluye las citoquinas IL-12, IFN- γ y TNF- α y activación de los radicales libres de oxígeno (FOR), óxido nítrico (NO) y sus metabolitos.

La acción de las citoquinas pueden tener un doble papel dependiendo del tejido y su concentración pudiendo perjudicar la gestación como ocurre con las citoquinas pro-inflamatorias (IFN- γ , IL-2, TNF- α), pero en el caso del IFN- γ este actúa contra *Neospora* pues se ha observado una mayor respuesta en vacas con fetos a término que en aquellas que abortaron (Innes et al., 2005).

La adquisición de inmunidad protectora que evita la transmisión vertical del parásito a sus crías se ha evidenciado en animales infectados experimentalmente con taquizoítos 6 semanas previas a la inseminación y reinfectados a mediados de gestación (Innes et al., 2001). Sin embargo cuando los animales sufren la infección por primera vez durante la gestación a los 140 días (Innes et al., 2001), 159-169 días (Andrianarivo et al., 2001) o en el segundo trimestre de gestación (Almería et al., 2003) la inmunidad adquirida no es suficiente para evitar la transmisión vertical ni los posibles abortos. Igualmente los animales infectados previamente a la gestación no adquieren inmunidad protectora suficiente con el contacto inicial con el parásito.

Se ha observado un estado de inmunosupresión transitoria de los linfocitos T (LT) periféricos frente antígenos de *N. caninum* y mitógenos tanto en ratones (Khan et al., 1997; Eperon et al., 1999) como en vacuno gestante (Innes et al., 2001). Esta inmunosupresión podría ser una de las causas de la mayor sensibilidad a la parasitación

en los animales gestantes y también el momento apropiado para que el parásito sea transmitido a la descendencia.

Por similitud con *Toxoplasma* y otros parásitos intracelulares, la inmunidad mediada por células (CMI) es la respuesta que parece jugar un papel más importante para evitar la multiplicación de *Neospora* en su hospedador reduciendo de ese modo la parasitemia y transmisión parasitaria. De hecho, el papel protector de citoquinas de tipo Th1, tales como el IFN- γ y la IL-12 ha sido descrito en infecciones experimentales por *N. caninum* (Khan et al., 1997; Marks et al., 1998; Baszler et al., 1999).

En las respuestas de tipo celular se ha evidenciado un papel fundamental de los LT CD4 que se estimulan con antígenos de *N. caninum* y actúan probablemente mediante la secreción de IFN- γ (Andrianarivo et al., 2001; Marks et al., 1998; Innes et al., 1995) inhibiendo la multiplicación de los taquizoitos. Por otro lado, se han involucrado también a los linfocitos citotóxicos CD8 en estas respuestas, al menos de manera parcial (Tanaka et al., 2000).

La respuesta inmune celular a *Neospora* es más efectiva al inicio de la gestación que en el segundo tercio (Buxton et al., 2002). En hembras gestantes infectadas experimentalmente la respuesta inmune celular parece estar ligada directamente con la reactivación y multiplicación de *Neospora* pues se ha observado una elevada respuesta al inicio y al final de la gestación y una disminución en la mitad de la gestación (Williams et al., 2000; Innes et al., 2001) lo cual coincide con la presencia de abortos principalmente en este período de gestación.

8. Cuadro clínico y lesional en ganado vacuno

8.1. Animales adultos.

El aborto es el principal síntoma clínico asociado a la neosporosis bovina, aunque otros cuadros como alteraciones neuromusculares, incapacidad para levantarse y peso menor al normal al nacimiento en terneros también han sido descritos (Dubey et al., 2006). La infección incrementa el periodo entre partos y el rango de reposición en los rebaños sobre todo en ganado lechero (Thurmond y Nietala, 1997). El aborto, puede presentarse tanto en forma epidémica como endémica, a cualquier edad del animal y repetirse varias veces. El aborto no suele ir acompañado de fiebre, anorexia o debilidad y suelen producirse entre el cuarto y el séptimo mes de gestación (media 5,6 meses). Los abortos tienen una cierta estacionalidad, posiblemente debido a la presencia/ausencia del huésped definitivo o un vector que contribuya a la diseminación del parásito (McAllister et al., 1996; Wouda et al., 1999).

Neospora caninum causa abortos tanto en ganado vacuno lechero como en ganado de carne en animales de cualquier edad. Los fetos pueden morir en el útero ser reabsorbidos, momificados, autolizados, nacer muertos o nacer vivos pero con síntomas clínicos o nacer clínicamente normales pero crónicamente infectados. Tanto en ganado de carne como en ganado de leche los animales seropositivos son más susceptibles de abortar que los seronegativos (Dubey y Sehares 2006). La transmisión congénita parece no estar afectada ni por la edad ni por el número de lactancias de la vaca aunque se ha observado que es más eficiente en animales jóvenes.

Más del 95% de los terneros de madres seropositivas nacen seropositivos pero clínicamente normales (Anderson et al., 2000; Buxton, et al., 2002).

En algunos casos puede haber reabsorción fetal y a veces retención del esqueleto o de los fetos momificados hasta el final de la gestación. El hallazgo de fetos momificados es considerado por algunos autores como sospechoso de brote de neosporosis.

Los fetos abortados presentan autólisis y acumulación serosanguinolenta en cavidades. Más raramente pueden verse puntos focales blanquecinos o zonas de decoloración en músculo esquelético y corazón. Histológicamente, los principales hallazgos son encefalitis local no supurativa con necrosis multifocal y miocarditis. El parásito parece presentar un marcado neurotropismo, ya que el parásito se identifica en el cerebro de casi todos los fetos investigados. Miositis focal no supurativa y hepatitis portal no supurativa con frecuentes áreas de necrosis parecen ser frecuentes (Boulton et al., 1995; Wouda et al., 1997).

8.2. Abortos epidémicos / Abortos endémicos

Los abortos pueden ser epidémicos o endémicos y cuando se presenta un episodio de abortos, en un 33% de los casos el brote dura pocos meses. Los abortos se consideran epidémicos si más del 10% de las vacas en riesgo abortan dentro de las seis a ocho semanas (revisado por Dubey, 2005).

La infección previa hace más resistentes a las vacas frente a una reinfección. Éste hecho es válido tanto en rebaños con brotes epidémicos (Schares et al., 2002) como en los rebaños con infección endémica, pues estudios epidemiológicos indican que en rebaños crónicamente infectados las hembras son más resistentes ante un reinfección y los fetos están más protegidos (revisado Dubey y Schares 2006).

Los brotes epidémicos suelen ocurrir como resultado de una infección reciente como consecuencia de una transmisión postnatal y en los fetos abortados las lesiones serán severas con un gran número de órganos afectados y gran cantidad de parásitos en ellos por lo que *Neospora* se considera causante directo del aborto en dichos brotes epidémicos.

En los brotes endémicos la infección es crónica y predomina la transmisión vertical y en los tejidos fetales abortados el mayor número de parásitos se observa en el cerebro pero con menor número de parásitos y menor daño celular.

8.3. Animales neonatales.

Los animales infectados congénitamente pueden nacer vivos. Los signos aparecen frecuentemente entre los 3 y 5 días de vida y en en ganado menor de dos meses de edad se han observado signos neurológicos y bajo peso al nacer, incapacidad para levantarse, las extremidades anteriores y/o las posteriores flexionadas o hiperextendidas, también pueden presentar ataxia y disminución de reflejos además de exoftalmia y ocasionalmente hidrocefalia y estrechamiento de la médula espinal (Dubey, 2005). Los animales además suelen presentar un peso más bajo de lo normal y debilidad.

En caso de no desarrollar la enfermedad, los animales estarán clínicamente sanos pero crónicamente infectados.

9. Diagnóstico.

El diagnóstico de neosporosis es difícil debido a la ausencia de signos clínicos en el ganado vacuno infectado crónicamente y el número bajo de parásitos presente en los fetos

abortados. Actualmente el diagnóstico en bovinos adultos se basa en la detección de anticuerpos específicos frente a *Neospora*. En fetos el diagnóstico se basa en las lesiones histopatológicas en tejidos de fetos abortados junto a la Inmunohistoquímica y PCR (Ortega-Mora y Aduriz, 2005).

9.1. Técnicas para la detección de anticuerpos de *N. caninum*.

El análisis del suero en vacas que han abortado indica la exposición al parásito pero es necesario el examen histopatológico de los tejidos de fetos abortados para confirmar el diagnóstico de neosporosis (Dubey, 2005). Para el estudio de los animales que han tenido contacto con el parásito se han utilizado distintas técnicas: Inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA, aglutinación directa (Romand et al., 1998) e inmunoblotting (Schaes et al., 1998; Schares et al., 1999).

Las técnicas serológicas son útiles para la demostración del contacto de los animales vivos con el parásito, aunque presentan un valor limitado a la hora de establecer de una manera individualizada que la causa del aborto es la infección por el agente (Pare et al., 1995, 1997; Dubey et al., 1997; McAllister et al., 1996) y por ello se debe realizar un análisis serológico general a nivel de rebaños.

La mayoría de terneros con anticuerpos precalostrales nacen clínicamente normales pero infectados y al no existir transmisión transplacentaria de anticuerpos de la madre al feto la detección de anticuerpos en suero o fluidos fetales indica infección fetal siempre que el ternero no haya tenido acceso al calostro (Ortega-Mora y Aduriz, 2005).

En fetos aunque cualquier fluido fetal es útil para el diagnóstico serológico el líquido peritoneal es el más útil.

La infección fetal se puede establecer tras la detección de anticuerpos en suero fetal pero un resultado negativo no es concluyente pues la síntesis de anticuerpos en fetos varía dependiendo del estado de gestación, nivel de exposición y el tiempo transcurrido entre la infección y el aborto (Dubey, 2005).

9.1.1. Inmunoblotting.

Esta técnica ha permitido analizar la composición antigénica *Neospora* a partir de sueros de diferentes especies y se han identificado antígenos inmunodominantes de 1, 29-30, 37, y 46 kDa (Bjerkas et al., 1994; Collantes, 2003).

El uso de antígenos específicos de *Neospora* en inmunoblotting ayuda a mejorar el diagnóstico (Dubey, 2005) y ha presentado una mayor sensibilidad al compararla con otras técnicas como IFI (Schaes et al., 1998; Söndgen et al., 2001) por lo que su mayor utilidad ha sido para confirmar casos dudosos aplicada en laboratorios de referencia más que como técnica de rutina (Björkman y Schares 2006)

9.1.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

La técnica que primero se desarrolló y de las más utilizadas para la detección de anticuerpos es la inmunofluorescencia indirecta (IFI), usando como antígeno taquizoítos procedentes de cultivos celulares. Aunque clínicamente la neosporosis cursa de forma similar a *Toxoplasma*, no presenta reacciones cruzadas en técnicas de IFI, por lo que esta prueba es muy específica (Dubey y Lindsay, 1996). Tampoco se observan reacciones cruzadas con otros parásitos de Phylum Apicomplexa. En vacuno títulos 1/640 (Conrad et al., 1993) o 1/200 (Dubey et al., 1997) han sido considerados positivos a la infección en

sucro de ganado adulto, y niveles mucho más bajos (1/80) en suero fetal. En la especie canina títulos 1/200 suelen coincidir con neosporosis clínica, aunque títulos 1/50 ya indican que el perro ha tenido contacto previo con el parásito (Barber et al., 1997). El problema de esta técnica radica en la subjetividad inherente a su sistema de interpretación.

9.1.3. ELISA indirecto.

Para el estudio de anticuerpos se han desarrollado técnicas de ELISA, algunas ya comercializadas y usadas de forma rutinaria. El antígeno son o bien proteínas de taquizoitos, taquizoitos enteros sonicados, taquizoitos fijados en formaldehído (Williams et al., 1997), antígenos recombinantes (Lally et al., 1996a) o antígenos incluidos en moléculas de complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (Björkman y Lunden, 1998). Aunque en algunas de ellas se han detectado reacciones cruzadas con *Sarcocystis* spp, en general la sensibilidad y la especificidad son adecuadas. Comparado con la IIT los resultados son fiables. Todas las técnicas tienen altos grados de sensibilidad y especificidad, pero la naturaleza y cantidad de los antígenos y conjugados usados resultan en bajas correlaciones o en resultados que discrepan (Dubey et al., 1997). Por otra parte la sencillez y rapidez en su realización e interpretación de los resultados son ventajas a tener en cuenta, sobre todo si se deben analizar un número elevado de muestras. En estudios comparativos de varias técnicas de ELISA frente *N. caninum*, se han considerado buenas correlaciones entre varios test (Wouda et al., 1998b). En un reciente estudio europeo (Von Blumröder et al., 2004) se procesó un mismo grupo de sueros con varios test de ELISA comerciales encontrando una alta concordancia entre ellos.

Recientemente se han descrito técnicas de ELISA para la detección de anticuerpos en leche (Bjorkman et al., 1997; Schares et al., 2004). Las pruebas de ELISA en leche permiten un análisis rápido en un gran número de animales siendo muy útil en estudios epidemiológicos de rebaños (Ortega-Mora y Aduriz, 2005).

9.1.4. ELISA de avidéz.

El ELISA de avidéz permite la diferenciación entre infecciones recientes y crónicas. Los anticuerpos al inicio de la infección por *Neospora* tienen una menor afinidad (fuerza de unión) que los anticuerpos que se producen posteriormente. Esta técnica permitirá diferenciar entre abortos epidémicos y endémicos tras el tratamiento con úrea que permite la "expresión" de los anticuerpos de baja afinidad que se encuentran en bajos niveles en las infecciones que han sido adquiridas recientemente. El ELISA iscom fue el primero descrito en medir la avidéz de anticuerpos IgG frente *Neospora* (Bjorkman et al., 1999). Posteriormente, otras técnicas de avidéz han sido descritas (Maley et al., 2001, Schares et al., 2002; Sager et al., 2003).

9.1.5. Aglutinación directa.

La técnica de aglutinación directa es una de las más utilizadas en el análisis de la infección por *Neospora* en animales silvestres. Permite de una forma muy sencilla, distinguir la presencia de anticuerpos en cualquier especie, sin necesidad de titulación ni uso específico del conjugado. Incluso realizando una reducción previa de la muestra permite diferenciar los niveles de anticuerpos IgM de los de IgG (Romand et al., 1998).

9.2. Técnicas de detección directa de *N. caninum*

9.2.1. Diagnóstico histopatológico.

El cerebro es el órgano afectado más frecuentemente pero la inspección de otros órganos como corazón, hígado, placenta y los fluidos corporales aumenta las posibilidades de confirmar el diagnóstico. En las muestras procedentes de necropsias de animales, especialmente en las procedentes de fetos abortados, la presencia de taquizoitos y/o quistes en el cerebro de casi todos los animales infectados, hace aconsejable el estudio histopatológico del tejido cerebral (Dubey, 1999a). La presencia y la extensión de lesiones patológicas específicas en cerebro, es un criterio que ayuda a definir un aborto causado por *N. caninum* (Gottstein et al., 1998; Jenkins et al., 2002) pues existe una encefalitis focal caracterizada por inflamación no supurativa y necrosis (revisado Dubey, 2005). Los taquizoitos se pueden observar mediante tinción de hematoxilina-eosina, aunque esta técnica no resulta muy sensible (Dubey, 2005). Es frecuente que los tejidos fetales estén autolisados por lo que las lesiones histopatológicas no serán visibles pero si podrán ser detectados con técnicas de inmunohistoquímica (IHC) (revisado Dubey, 2005).

9.2.2. Inmunohistoquímica (IHC).

La técnica de IHC en los cortes que presentan lesiones puede evidenciar la presencia de estadios parasitarios de *Neospora* en dichas lesiones de una manera específica y más sensible (Lindsay and Dubey, 1989; Wouda et al., 1997). Sin embargo, muchas veces los tejidos presentan autólisis elevada y estos estudios no pueden realizarse con completa seguridad de detección. También hay problemas de falsos positivos (el tratamiento con tripsina o pepsina de los tejidos o su no tratamiento puede influir sobre los resultados).

La técnica de IHC permite confirmar el diagnóstico del aborto debido a neosporosis pero es poco sensible en parte por el escaso número de parásitos en los tejidos y como se pudo confirmar también en un reciente estudio europeo entre diferentes laboratorios que encontraron baja sensibilidad posiblemente debido a diferencias tanto en el procedimiento como en la habilidad en la lectura de los resultados. Sin embargo todos coincidían en la alta especificidad en esta técnica (van Maanen et al., 2004).

9.2.3. Aislamiento en cultivo celular o inoculación en ratón.

El aislamiento de *Neospora* en cultivos celulares a partir de restos fetales es otra prueba diagnóstica pero resulta difícil por las condiciones generalmente de autólisis del feto.

9.2.4. PCR.

La técnica más actual de diagnóstico directo se basa en la detección del DNA del parásito por técnicas de biología molecular mediante PCR. Estas técnicas son de gran utilidad para el diagnóstico porque permiten la amplificación de cantidades muy pequeñas de DNA del parásito y permiten la detección de un sólo parásito en la muestra (Liddell et al., 1999). Entre estas técnicas hay unas basadas en la ampliación de la región ITS1 del DNA ribosomal (Holmdahl y Mattsson, 1996; Homan et al., 1997), las que amplifican fragmentos de la región No5 del DNA genómico (Muller et al., 1996; Liddell et al., 1999) y las que utilizan el gen 14-3-3 de *N. caninum* (Lally et al., 1996b) La detección es relativamente rápida y la sensibilidad y especificidad son muy elevadas. Se llegan a detectar contaminaciones de un único taquizoito en la muestra. Permiten detectar DNA

del parásito en cerebro de fetos tras ser fijado con formol e incluido en parafina (Dubey, 2005).

Los criterios para diferenciar una infección fetal por *Neospora* todavía deben ser definidos (Jenkins et al., 2002). Dada la distribución focal del parasitismo y el bajo número de parásitos presentes, es necesario valorar la capacidad de detección de varias técnicas para proponer un protocolo normalizado de trabajo que logre el diagnóstico más adecuado (Pereira-Bueno et al., 2003). La recogida de suero o líquido peritoneal en los fetos abortados para evidenciar la presencia de anticuerpos y la infección congénita del mismo es también recomendable.

El éxito en el diagnóstico con PCR depende tanto del laboratorio como del estado de autólisis de los tejidos aunque puede realizarse exitosamente aún incluso en tejidos autolíticos e independientemente del procedimiento de muestreo (revisado Dubey, 2005).

Actualmente las PCR anidadas o semianidadas aportan una elevada sensibilidad y especificidad mejorando la detección de *Neospora* en los diferentes tejidos (Ortega-Mora y Aduriz, 2005). Pero un reciente estudio entre laboratorios europeos que comparó ambas técnicas encontró una elevada concordancia entre los resultados pero no dejó claro cual de los procedimientos (PCR anidada o no) presenta ventajas en la sensibilidad (van Maanen et al., 2004).

El desarrollo reciente de la PCR cuantitativa ha permitido evaluar la acción terapéutica de tratamientos y vacunas (Dubey y Schares et al., 2006). También ha sido de utilidad diagnóstica para determinar la carga parasitaria en semen de toros positivos a *N. caninum* (Caetano-da-Silva et al., 2004).

9.3. Diagnóstico diferencial.

Neospora caninum está altamente relacionado con otros apicomplexa como *T. gondii* y *Sarcocystis* spp. que también pueden producir aborto en ganado bovino pero no suelen presentarse reacciones cruzadas y pueden diferenciarse con inmunohistoquímica y PCR. Además la infección por *T. gondii* es poco frecuente en ganado vacuno y *S. cruzi* se localiza principalmente en endotelio vascular y es poco frecuente observarlo en cerebro (Dubey, 2005).

Entre los agentes víricos relacionados con abortos se han de incluir la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), el herpesvirus bovino 1 y 4 (BHV-1 y BHV-4) y la diarrea bovina vírica (BVD). De hecho, algunos estudios han observado asociación entre la presencia de anticuerpos a esta última y a *Neospora* (Bjorkman et al., 2000).

También se deben diferenciar de agentes bacterianos como *Brucella* spp., *Actinomyces pyogenes*, *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Campylobacter foetus*, *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., y *Pseudomonas* sp. Así como incluir en el diagnóstico los abortos por causas no infecciosas, siempre teniendo presente que en un gran porcentaje de casos quedan sin determinar las causas del aborto (Wouda 2006).

10. Tratamiento, control y profilaxis.

10.1. Tratamiento.

El tratamiento farmacológico sólo se ha planteado en casos clínicos de perros. En estos casos, el tratamiento más eficaz es la clindamicina, según se ha observado en un caso de miositis y otro de dermatitis piogranulomatosa causada por neosporosis tras 45 días de tratamiento (revisado Dubey, 2003). Si el diagnóstico es precoz se puede utilizar

sulfadiazina/trimetoprim y pirimetamina, aunque no son efectivos si ya existe parálisis o rigidez de extremidades (Duhay et al., 1998)

Aunque se han testado distintos productos sobre cultivos celulares de taquizoitos, tales como lasalocid, monensina, piretrezim, pirimetamina y trimetoprim y se logra prevenir la multiplicación intracelular de *Neospora* no hay tratamiento efectivo en los rebaños. En el modelo murino se han obtenido buenos resultados con el toltrazuril y el ponazuril (Gottstein et al., 2001) y éste último ha sido utilizado en terneros (Kritzner et al., 2002).

10.2. Control en rebaños infectados.

El control en los rebaños vacunos en los que las pérdidas económicas son importantes es fundamental para prevenir la propagación de la infección evitando tanto la transmisión horizontal como la vertical y por tanto debe basarse en el control de los animales positivos a la infección. Es necesario conocer la prevalencia de seropositividad en el rebaño. Si la seroprevalencia en el rebaño es lo suficientemente baja y el coste económico puede ser asumido por el ganadero, entonces es recomendable eliminar las hembras seropositivas (French et al., 1999). Esta drástica medida ha sido altamente efectiva en el control de la neosporosis en rebaños con predominio de transmisión vertical (Hall et al., 2006). En caso contrario se deben controlar las hembras e hijas de vacas que abortaron y/o son seropositivas. La infección congénita se detectará en sueros recogidos antes de la primera toma de calostro. Otra medida necesaria es el control de los animales de reposición, excluir animales seropositivos o incluso seronegativos procedentes de madres seropositivas. Además, una vez conocido el IID, se debe reducir la exposición de los perros a tejidos infectados por el parásito, eliminar lo antes posible los fetos abortados, placentas y vacas muertas y llevar a cabo estrictas medidas de higiene, especialmente durante las épocas del parto. Este aspecto es especialmente importante para el control de la enfermedad a largo plazo (French et al., 1999).

Otra medida que se ha empleado en animales valiosos es la transferencia de embriones de animales seropositivos a hembras seronegativas (Baillargeon et al., 2001). Como se ha indicado, la infección del feto a través de la placenta (transmisión vertical) es una de las principales vías de transmisión de la enfermedad y del mantenimiento de la misma en el rebaño, por lo que el control sanitario de la enfermedad exige siempre que sea posible descartar las vacas seropositivas como reproductoras. Ésto acarrea importantes pérdidas económicas si las vacas infectadas son animales de alto valor genético cuya genética interesa expandir. Estudios previos indican que los sucesivos lavados que se realizan en la manipulación de los embriones en la técnica de transferencia embrionaria, pueden ser suficientes para eliminar la posible presencia del parásito y permiten utilizar dicha técnica como un método de control de la transmisión vertical de *N. caninum* en ganado vacuno (Baillargeon et al., 2001; Bielansky et al., 2002).

Se ha evidenciado que la inseminación de vacas lecheras seropositivas a *N. caninum* con semen de vacuno de carne, especialmente con la raza Limousin, además de tener como aspecto práctico no dejar reposición seropositiva en el rebaño, reduce de manera significativa el riesgo de aborto en las mismas (López-Gatius et al., 2005a; García-Ispuerto et al., 2005). Este aspecto se ha valorado como de gran importancia e incluido en las medidas de control de la neosporosis consensuado en el último congreso mundial de parasitología.

Los modelos matemáticos utilizados para evaluar las medidas de control en el tiempo han indicado que el muestro anual y el descarte de los seropositivos reduce rápidamente la seroprevalencia en un rebaño pero el descartar las hembras con descendencia positiva es a largo plazo según un modelo matemático la medida de control económicamente más rentable. Mientras otras estrategias como la aplicación de quimioterapia en terneros descendientes de vacas seropositivas y la vacunación de animales susceptibles e infectados aunque eficientes no lo son tanto como el descarte selectivo (Hasler et al., 2006a y b). Algo similar ocurre con la aplicación de modelos matemáticos en rebaños de ganado de carne pues se ha observado que el muestreo anual de todo el rebaño y el descarte de las hembras con descendencia positiva es altamente efectiva en el control de la neosporosis (Larson et al., 2004).

10.3. Profilaxis.

Las medidas de prevención de la neosporosis han de tener como objetivo evitar la infección fetal pero al no haber actualmente un método eficaz de control ni eliminación, adquiere gran importancia las prácticas de manejo en los rebaños lecheros. En rebaños no infectados se debe prevenir el contacto con el parásito introduciendo sólo animales negativos y repitiendo el muestreo para evitar los falsos negativos. Paralelamente se debe evitar el contacto de perros a las áreas de alimentación y evitar el contacto de perros con tejidos fetales y realizar análisis de todas las hembras que aborten así como de los fetos abortados y la placenta.

Actualmente existe una vacuna comercial en Estados Unidos pero su eficiencia no es clara en la prevención del aborto por *Neospora* (revisado Dubey, 2005; Innes et al., 2002).

11. Bibliografía

- Almería S, Ferrer D, Pabón M, Castellà J, Mañas S. 2002. Red foxes (*Vulpes vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 107: 287-294.
- Almería S, De Marez T, Dawson H, Araujo R, Dubey JP, Gasbarre LC. 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental infection with *Neospora caninum* in heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25: 383-392.
- Almería S, Araujo R, Tuo W, Dubey JP, Gasbarre LC. 2004. Histological analysis and parasite detection in dam and foetus in experimental infection of pregnant cows with *Neospora caninum*. *COST 854*. Derio.
- Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *JAVMA*; 198: 2: 241- 244.
- Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, et al. 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J Am Vet Med Assoc*; 207: 1206-1210.
- Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD, Sverlow KW, Packham AE, Barr BC, Conrad PA. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc*; 210 (8): 1169-72.
- Anderson ML, Andriantavio AG, Conrad PA. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci* 60:61, 417-431.
- Andriantavio AG, Barr BC, Anderson ML, Rowe JD, Packham AE, Sverlow KW, Conrad PA. 2001. Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol Res*; 87: 817-825.
- Bailhargeon P, Fecteau G, Paré J, Lamothe P, Sauvé R. 2001. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. *JAVMA*, 11: 1803-1806.

Barber JS, Gasser RB, Ellis J, Reichel MP, McMillan D, Trees AJ. 1997. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J Parasitol.* 83:1056-1058.

Barberán M, Cebrián L, Gil J. 1997. Identificación de *Neospora* sp. en brútes de aborto en ganado bovino en Aragón. *ITGA.* 18:II 621-623.

Barling KS, Sherman M, Peterson MJ, Thompson JA, McNeill JW, Craig TM, Adams LG. 2000. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *JAVMA.* 217:9. 1361-1365.

Barlels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quiteria A, Björkman C, Frossling J, von Blumroder D, Conraths LJ, Schares G, van Maanen C, Wouda W, Ortega-Mora LM. 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet Parasitol* 137: 17-27.

Bartley PM, Kirvar E, Wright S, Swales C, Esteban-Redondo I, Buxton D, Mailey SW, Schock A, Rae AG, Hamilton C, Innes EA. 2004. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *J Comp Pathol.* Feb-Apr;130:2-3:81-91

Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA. 1991. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet Pathol.* 28: 110-116.

Basso W, Venturini I, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, Dubey JP. 2001. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol.* Jun;87:3:612-8.

Baszler TV, Long MT, McElwain TE, Mathison BA. 1999. Interferon-gamma and interleukin 12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int. J Parasitol.* 29:1635-1646.

Bergcron N, Ferteau G, Villeneuve A, Girard C, Pare J. 2001. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 97 (2) 145-52

Berzal Herranz, B, Mainar Jaime RC, Thurmond MC, Hietala SK. 1998. Análisis por rebaños de la prevalencia frente a *Neospora caninum* en la región centro-costa asturiana. *El boletín de Anembe.* 15:20-21

Bielansky A, Robinson J, Phipps-Todd B. 2002. Effect of *Neospora caninum* on in vitro development of preimplantation stage bovine embryos and adherence to the zona pellucida. *Veterinary Record.* 150:316-318

Bjerkas I, Presthus J. 1989. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoan in dogs. *APMIS.* May;97:5:459-68

Bjerkas I, Jenkins MC, Dubey JP. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1994 Mar;1(2):214-21.

Björkman C, Lundén A. 1998. Application of iscom antigen preparations in ELISAs for diagnosis of *Neospora* and *Toxoplasma* infections. *Int J parasitol.* 28:187-193.

Björkman, C and Schares G. 2006. COSI 854. Diagnostic workshop on protozoal abortions in farm ruminants.

Björkman C, Johansson O, Stenlund S, Holndahl OJ, Uggla A. 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* May 1;20:9:1441-4.

Björkman C, Holndahl OJ, Uggla A. 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet Parasitol.* 68 (3) 251-260.

Björkman C, Näslund K, Stenlund S, Mailey S W, Buxton D, Uggla A. 1999. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 41-44.

Björkman C, Alenius S, Manuelsson U, Uggla A. 2000. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortions. *Vet J.* 159(2):201-6.

Boulton JG, Gill PA, Cook RW, Fraser GC, Harper PA, Dubey JP. 1995. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Aust Vet J.* Mar;72:3:119-20.

Buxton D, Milton M, McAllister J, Dubey JP. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends in parasitology.* Vol 18, 1 Diciembre. 546-552.

Caetano-da-Silva A, Ferre J, Aduriz G, Alvarez-Garcia G, del-Pozo I, Atxaerandio R, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora JM. 2004. *Neospora caninum* infection in breeder bulls; seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. *Vet Parasitol.* Sep 20;124(1-2):19-24

Collantes Fernandez E. 2003. Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental. Tesis doctoral

Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuler G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Ariens A, Dubey JP, Duhamel G, Harr B. 1993. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn. Invest.* 5:572-578.

Chaouat G, Zourbas S, Ostojic S, Lappree-Delage G, Dubanchet S, Ledee N, Martial J. 2002. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-fœtal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J Reprod Immunol.*53:241-256

Davison HC, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Williams DJ, Kelly DF, Trees AJ. 2001. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res Vet Sci.*70(2) 163-8

Davison HC, Otter A, Trees AJ. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 29. 10:1683-1690.

De Meerschman F, Speybroeck N, Berkvens D, Reltignera C, Focart C, Lœdliptoux F, Cassart D, Loozon H. 2002. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology.* Sep;58.5. 933-45.

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

Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Wouda W. 2001. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31. 209-215.

Druckmann R, Druckmann MA. 2005. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 97:389-396.

Dubey, JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasit.* 1999a; 84 (3-4) 349-367.

Dubey, JP. Neosporosis -the first decade of research. *Int J Parasitol.*, 1999b; 29 (10) 1485-1486.

Dubey, J.P. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol* 2003; 89 S42- S56.

Dubey JP. Neosporosis in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2005 Jul;21(2):473-83. Review

Dubey JP, Lindsay DS. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 67:1-59

Dubey JP, Schares G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol.* Aug 31;140.1-2:1-34.

Dubey JP, Dualliez P. 2005. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in wild animals. *J Parasitol.* Oct;91.5. 1217-8

Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. 1988a. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1988 May 1;192(9):1269-85.

Dubey JP, Hattel AI., Lindsay DS, Topper MJ. 1988b. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc.* 1988 Nov 15;193(10):1259-63.

Dubey JP, Jenkins MC, Adams DS, McAllister MM, Anderson-Sprecher R, Baszler TV, Kwok OCH, Lally NC, Hjrdrkman C, Uggla A. 1997. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J Parasitol.*; 83.6,1063-1069.

Dubey JP, Dorrough KR, Jenkins MC, Liddell S, Speer CA, Kwok OC, Shen SK. 1998. Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int J Parasitol.* 28.8:1293-304

Dubey JP, Liddell S, Mattson D, Speer CA, Howe DK, Jenkins MC. 2001. Characterization of the Oregon isolate of *Neospora hughesi* from a horse. *J Parasitol.* Apr;87.2:345-53.

Dubey JP, Hill DE, Lindsay DS, Jenkins MC, Uggla A, Speer CA. 2002. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. *Trends Parasitol.* Feb;182:66-9

- Dobey JP, Buxton D, Wouda W. 2006 Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol.* May;134.4:267-89.
- Ellis J, Lunon K, Baverstock PR, Brindley PJ, Nimmo KA, Johnson AM. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum*. *Mol Biochem Parasitol.* 64.2:303-11
- Ellis JT, McMillan D, Ryeo C, Payne S, Atkinson R, Harper PA. 1999. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *Int J Parasitol.* 10:1589-96
- Eperon S, Bronnimann K, Hemphill A, Gottstein B. 1999. Susceptibility of B-cell deficient C57BL/6 (MM) mice to *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunol.* 21: 225-236.
- Ferroglio E, Wambwa E, Castiello M, Triscioglio A, Prouteau A, Pradere F, Ndungu S, De Meneghi D. 2003. Antibodies to *Neospora caninum* in wild animals from Kenya, East Africa. *Vet Parasitol* 118,43-49.
- Fondevila D, Añor S, Pomarola M, Dobeý JP. 1998. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. *Vet Parasitology.* 77: 187-190.
- French NP, Clancy D, Davison BC, Trees AJ. 1999. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int J Parasitol.* 29:10:1691-1704.
- García-Ispuerto I, López-Gálvez F, Santolaria P, Yáñez J, Nogareda C, Pabón M, López-Déjar M, Almeria S. 2005. The use of Limousine bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora* seropositive dairy cows. COST 854 Annual Meeting "Reservoirs of protozoan abortifacients in livestock and wildlife". Working Group 4 "Epidemiology, risk assessments, economics and control. *Wiadomości Parazytologiczne, tom 51 supplement, pag 42-43.*
- Gondim LF. 2006. *Neospora caninum* in wildlife. *Trends Parasitol.* 2006; Jun;22(6):247-52.
- Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 34: 159-161.
- Gondim LF, McAllister MM, Gao L. 2005. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Vet Parasitol.* 134(1-2):33-9.
- Gonzalez L, Buxton D, Atxaerandio R, Aduriz G, Maley S, Marco J, Cuervo L. 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet Rec.* 144: 145-150
- Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thur B, Basuto A, Stark KDC, Muller N. 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28:679-691.
- Gottstein B, Eperon S, Dai WJ, Cannas A, Hemphill A, Greif G. 2001. Efficacy of toltrazuril and ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol Res.* 87(1):43-8.
- Guy CS, Williams DJL, Kelly DE, McGarry JW, Guy F, Ujörkman C, Smith RF, Trees AJ. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec* 149, 443-449.
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol.* Mar 31;128.3-4:231-41
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. 2006. Performance characteristics and optimisation of cut-off values of two enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of antibodies to *Neospora caninum* in the serum of cattle *Vet Parasitol.* Aug 31;140.1-2:61-8.
- Hasler B, Stark KD, Sager H, Gottstein B, Reist M. 2006a. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. *Prev Vet Med.* Dec 18;77.3-4:254-83.
- Hüsler B, Regula G, Katharina D.C, Sager H, Gottstein B, Reist M. 2006b. Financial analysis of various strategies for the control of *Neospora caninum* in dairy cattle in Switzerland *Prev Vet Med.* Dec18;77.3-4:230-53.
- Hemphill A. 1999. The host-parasite relationship in neosporosis. *Adv Parasitol.* 43:47-104.
- Hemphill A, Gottstein B, Kaufmann B. 1996. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology.* Feb;112.Pt 2:183-97.

- Hemphill A, Vonlaufen N, Naguleswaran A, Keller N, Riesen M, Guetg N, Srinivasan S, Alaeddine F. 2004. Tissue culture and explant approaches to studying and visualizing *Neospora caninum* and its interactions with the host cell. *Microsc Microanal Oct*,10 5 602-20
- Heydorn AO, Mehlhorn H. 2002. *Neospora caninum* is an invalid species name: an evaluation of facts and statements. *Parasitol Res Feb*,88 2 175-84
- Hietala SK, Thurmond MC. 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serological responses in two daries. *Int J Parasitol* 29 10 1669- 1676
- Homan WL, Lämper L, Verlaan M, Borst A. 1997. Vercauteren, M., Knapen, F van. Comparison of the internal transcribed spacer, ITS 1, from *Toxoplasma gondii* isolates and *Neospora caninum*. *Parasitology Research* 83 285-289
- Holmdahl OJM, Mattsson JG. 1996. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by in vitro amplification of the internal transcribed spacer I. *Parasitology* 112 177-182
- Holmdahl OJ, Mattsson JG, Uggla A, Johansson KB. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FFMS Microbiol Lett* 119 1-2 187-92
- Innes EA, Panton WRM, Marks J, Trees AJ, Holmdahl J, Buxton D. 1995. Interferon gamma inhibits the intracellular amplification of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *J Comp Pathol* 113 95-100
- Innes EA, Buxton D, Maley S, Wright S, Marks J, Esteban I, Rae A, Schock A, Wastling J. 2000. Neosporosis: Aspects of epidemiology and host immune response. *Ann N Y Acad Sci* 916 93-101
- Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey JM, Buxton D. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol* Nov,31 13 1523-34
- Innes EA, Andrianarivo AG, Bjorkman C, Williams DJL, Conrad PA. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol* 18,497-504
- Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macalodowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D. 2005. The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol* 108, 29-36
- Jardine JF. 1996. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet Parasitol Apr*,62 3-4 231-40
- Jenkins M, Baszler T, Bjorkman C, Schares G, Williams D. 2002. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int J Parasitol* 32 631-636
- Khan IA, Schwartzman JD, Fonseka S, Kasper LJ. 1997. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp Parasitol Jan*,85 1 24-34
- Kidd P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and its implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8,223-246
- Koiwai M, Hamauka T, Hantani M, Shimizu S, Tsutsui T, Eto M, Yamane I. 2005. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle with reproductive disorders in Japan. *Vet Parasitol Jun* 10,130 1-2 15-8
- Kritzer S, Sager H, Blum J, Krebber R, Grotz G, Gottstein B. 2002. An explorative study to assess the efficacy of toltrazuril-sulfone (ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob Oct* 18,1 4
- Landmann JK, Jillella D, O'Donoghue PJ, McGowan MR. 2002. Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Aust Vet J Aug*,80 8 502-3
- Lally NC, Jenkins MC, Dubey JP. 1996a. Evaluation of two *Neospora caninum* recombinant antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996 3(3) 275-9
- Lally NC, Jenkins MC, Dubey JP. 1996b. Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3- gene. *Mol Biochem Parasitol* 75 169-178
- Larson RL, Hardin BK, Pierce VI. 2004. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *J Am Vet Med Assoc* 224 10 1597-604

Liddle S, Jenkins MC, Dubey JP. 1999. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 29.10.1583-1588.

Lindsay DS, Dubey JP. 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am J Vet Res. 50:1981-1983.

Lindsay DS, Kelly EJ, McKown RD, Stein FJ, Pfozer J, Herman J, Blagburn BL, Dubey JP. 1996. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. J Parasitol. Aug;82.4. 657-9.

Lindsay DS, Upton SJ, Dubey JP. 1999. A structural study of *Neospora caninum* oocyst. Int J Parasitol.29.10.1521-1524.

Lohato J, Silva DA, Mfinon JW, Amara J, Segundo GR, Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR. 2006. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. Clin Vaccine Immunol13,84-89.

Long MT, Baszler JV. 2000. Neutralization of maternal IL-4 modulates congenital protozoal transmission: comparison of innate versus acquired immune responses. J Immunol. 164:4768-4774.

Lopez-Gatius F, Pabon M, Almeria S. 2004. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. Theriogenology. Aug;62.3-4.606-13

López-Gatius F, Santolaria P, Yáñez JL, Garbayo JM, Almeria S. 2005a. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. J Vet Med B 52:88-92

López-Gatius F, García-Isperto J, Santolaria P, Yáñez JL, López-Béjar M, Nogareda C, Almeria S. 2005b. Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortions in two dairy herds in a dry environment. J Vet Med B 52,147-152.

Mainer Jaime RC, Thurmond MC, Herzal Herranz B, Hietala SK. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. Vet record. 145:72-75.

Maley SW, Buxton D, Thomson KM, Schrieter CE, Innes EA. 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. Vet Parasitol. 96, 1-9.

Marks J, Lunden A, Harkins S, Innes E. 1998. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. Paras Immunol. 20:303-309

Mehlhorn H, Heydorn AO. 2000. *Neospora caninum*: is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. Parasitol Res. Feb;86.2.169-78.

Mellor AL, Munn DH. 2000. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. Annu Rev Immunol.18:367-91.

McAllister MM, Huffman EM, Hietala SK, Conrad PA, Anderson ML, Salman Mo D. 1996. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. J Vet Diagn Invest.8:355-357.

McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol.28:1473-1478.

McAllister MM, Bjorkman C, Anderson-Sprecher R, Rogers DG. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. J Am Vet Med Assoc. 217, 881-887.

Michie C. 1998. Th1 and Th2 cytokines in pregnancy, from a fetal viewpoint. Immunol Today 19,333.

Moore DJ, Campero CM, Oleon AC, Posso MA, Cairo D, Leunda MR, Basso W, Venturini MC, Spath E. 2002. Seroprevalence of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. Vet Parasitol. Aug 22;107.4.303-16

Mugridge NB, Morrison DA, Heckerroth AR, Johnson AM, Tenter AM. 1999. Phylogenetic analysis based on full-length large subunit ribosomal RNA gene sequence comparison reveals that *Neospora caninum* is more closely related to *Hammondia heydorni* than to *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. Oct;29.10. 1545-56.

- Muller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. 1996. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. J Clin Microbiol. 34:2850-2852.
- Nam HW, Kang SW, Choi WY. 1998. Antibody reaction of human anti-*Toxoplasma gondii* positive and negative sera with *Neospora caninum* antigens. Korean J Parasitol. Dec;36:4:269-75
- Nayateswaran A, Muller N, Hemphill A. 2003. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*: a novel adhesion/invasion assay reveals distinct differences in tachyzoite-host cell interactions. Exp Parasitol. Jul-Aug; 104:3-4:149-58.
- Ortega-Mora LM, y Aduriz G. 2005. Nuevas perspectivas en el diagnóstico laboratorial de las protozoosis tisulares reproductivas en los rumiantes domésticos. X Simposio Anual AVEDILA.
- O'Toole D, Jeffrey M. 1987. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf. Vet Rec. Dec 12; 121:24, 563-6
- Paulo J A, Ian R H, VanLeeuwen D J A. 2005. A review of *Neospora caninum* in dairy and beef cattle – a Canadian perspective. Can. Vet. J. 46:230-243
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. 1995. An enzyme-linked immunosorbent (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* spp. infection in cattle. J. Vet. Diag. Invest. 7: 352-359.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. J. Parasitol. 83: 82-87.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Seijas-Carballado A, Costas E, Ortega-Mora LM. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations. Int J Parasitol. 30: 906-909.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez, V, Jespi-Felgueroso A, Alvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora L.M. 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. Vet. Parasitol. 111: 143-152.
- Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Bjorkman C, Hggla A. 1999. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. Emerg Infect Dis. 2: 278-80
- Peters M, Lutkefels E, Heckerath AR, Schares G. 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cyst in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. Int J Parasitol 31: 1144-1148.
- Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. 2002. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? Trends Parasitol. 9:391-4.
- Quintanilla-Gozalo MA, Pereira-Bueno JM, Seijas-Carballado A, De la Fuente R, Ortega Mora LM. 1996. Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Neospora* sp en un rebaño bovino con antecedentes de aborto. IV Congreso Internacional de Medicina Bovina-Arembe. Octubre 2-6. p 107.
- Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Tahares E, Innes EA, Gonzalez-Paniello R, Ortega-Mora LM. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. Int J Parasitol. Aug;29:8:1201-8
- Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Seijas-Carballado A, Costas E, Ortega-Mora LM. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. Int. J. Parasitol. 30:901-906.
- Romand S, Thulliez P, Dubey JP. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. J.P. Parasitol. Res. 60: 50-53.
- Raghupathy R. 1997. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. Immunol Today. Oct;18:10:478-82
- Sanderson MW, Gray JM, Baszler TV. 2000. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. Vet Parasitol 90:15-24.
- Sager H, Gloor M, Bjorkman C, Krözner S, Gottstein B. 2003. Assessment of antibody avidity in aborting cattle by a somatic *Neospora caninum* tachyzoite antigen IgG avidity ELISA. Vet Parasitol. Feb 28; 112:1-2:1-10

- Sawada M, Kondo H, Tomioka Y, Park C, Morita T, Shimada A, Umemura T. 2000. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Vet Parasitol.* Jun 27;90 3:247-52.
- Schares G, Peters M, Wurm R, Barwald A, Conraths FJ. 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol.*80 87-98.
- Schares G, Rauser M, Zimmer K, Peters M, Wurm R, Dubey JP, De Graaf DC, Jidelhofer R, Mertens C, Hess G, Conraths FJ. 1999. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *J Parasitol.* 85 688-694.
- Schares G, Wenzel U, Müller T, Conraths FJ 2001. Serological evidence for naturally occurring transmission of *Neospora caninum* among foxes (*Vulpes vulpes*). *Int J Parasitol.* 2001 31(4):418-23.
- Schares G, Barwald A, Staubach C, Sondgen P, Rauser M, Schroder R, Peters M, Wurm R, Selhorst T, Conraths FJ. 2002. P38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol.* Jul 2;106.4:293-305.
- Schares G, Barwald A, Staubach C, Wurm R, Rauser M, Conraths FJ, Schneider C 2004. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Vet Parasitol.* 2004 Feb 26;120.1-2:55-63
- Schares G, Pantchev N, Barutski D, Heydorn AO, Bauer C, Conraths FJ. 2005. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *Int J Parasitol.*Dec;35.14:1525-37.
- Sedlak K and Bartova E, 2006. Seroprevalences to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Vet Parasitol* 136:223-231.
- Soldati S, Küpfer M, Wise A, Maes R, Botteron C, Robert N. 2004. Meningoencephalomyelitis caused by *Neospora caninum* in a juvenile fallow deer (*Dama dama*). *J Vet Med A* 51:280-283.
- Sondgen P, Peters M, Barwald A, Wurm R, Holling F, Conraths FJ, Schares G. 2001. Bovine neosporosis: immunoblot improves faecal serology. *Vet Parasitol.* Dec 28;102.4:279-90
- Speer CA and Dubey JP. 1989. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. *J Protozool.* Sep-Oct;36.5:158-63
- Tanaka T, Hamada T, Inoue N, Nagasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Mikami T. 2000. The role of CD4+ or CD8+ T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 90 183-191.
- Thilsted JP and Dubey JP. 1989. *Neospora*-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest.* 1 205-209.
- Thurmond MC and Hietala SK. 1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58,1381-1385.
- Trees AJ, Williams DJL. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21, 558-561.
- van Maanen C, Wouda W, Schares G, von Blumroder D, Conraths FJ, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Innes EA, Mattsson JG, Björkman C, Fernandez-Garcia A, Ortega-Mora LM, Müller N, Sager H, Hemphill A. 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol.* Dec 30;126.4:351-64.
- von Blumroder D, Schares G, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Wright S, Björkman C, Frossling J, Risco-Castillo V, Fernandez-Garcia A, Ortega-Mora LM, Sager H, Hemphill A, van Maanen C, Wouda W, Conraths FJ. 2004. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet Parasitol.*120(1-2):11-22.
- Weiss JM, Ma YF, Halonen S, McAllister MM, Zhang YW. 1999. The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. *Int J Parasitol.* Oct;29.10:1713-23
- Wegmann TG, Li JJ, Guilbert L, Mossman TR. 1993. Bidirectional cytokines interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon?. *Immunol today.*14 353-356.
- Williams DJL, McGarry J, Guy F, Barber J, Trees AJ. 1997. A novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet Record.* 140 328-331.

- Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DF, Trees AJ. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*. Oct;121 Pt 4:347-58.
- Williams DJL, Guy CS, Smith RF, Guy F, McGarry JW, McKay JS, Trees AJ. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 33:1059-1065.
- Woffenson D, Roth Z, Meidan R. 2000. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci.* Jul 2;60-61:535-47
- Wouda W. 2000. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: a review. *Vet Q.* Apr;22:2:71-4
- Wouda W. 2006.COST 854. Diagnostic workshop on protozoal abortions in farm ruminants
- Wouda W, Moen AR, Visser LJ, Van Knapen F. 1997. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J Vet Diagn Invest*;9:180-185.
- Wouda W, Moen AR, Schukken YH. 1998a. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology.* 1998 49(7):1311-6.
- Wouda W, Brinkhof J, Van Maanen C, de Gee AJ, Moen AR. 1998b. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds, a comparative study of three enzyme linked immunosorbent assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 711-716.
- Wouda W, Dijkstra TH, Kramer AMH, van Maanen C, Brinkhof JMA. 1999. Seropidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 29.10.1677-1682.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

I. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS: TÉCNICAS SEROLÓGICAS

1.1. ELISA (Inmunoensayo de enzima ligada)

Para la detección de la IgG anti *N. caninum* en suero se emplearon dos técnicas comerciales de ELISA indirecto: Herdcheck® de laboratorios IDEXX S. A. (E.E.U.U) y CIVTEST® de laboratorios HIPRA S. A. (España). Estas técnicas utilizan como antígeno extracto soluble de taquizoitos que se encuentra adherido a las placas de titulación mediante métodos convencionales. Todos los sueros se analizaron en dilución 1:100 tras una doble dilución a partir de una dilución inicial de 1:20. Como conjugado se utilizó un anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa. En cada analítica se utilizaron por duplicado los controles negativos (CN) y positivos (CP) incluidos en el test para validarlo. En ambos casos se siguieron las recomendaciones del fabricante empleándose los reactivos y sueros testigo suministrados por la casa comercial. La reacción colorimétrica en cada pocillo se midió utilizando un lector de ELISA a una longitud de onda de 405nm en el caso del ELISA CIVTEST® y de 650 nm en el ELISA Herdcheck®. La interpretación de los resultados varió en función del ELISA empleado.

CIVTEST®

Para la interpretación de los resultados se calculó el índice relativo x 100 (IRPC)

Validación del test

El test se considera válido si la O.D₄₀₅ media del CP es superior a 0.9 y la relación (media O.D₄₀₅ del CP/ media O.D₄₀₅ del CN) es superior a 5.

Cálculos

$$\text{IRPC} = \frac{\text{D.O.}_{405} \text{ Muestra} - \text{Media D.O Control Negativo}}{\text{Media D.O}_{405} \text{ Control positivo} - \text{Media D.O.}_{405} \text{ Control negativo}} \times 100$$

Interpretación de los resultados

Las muestras de suero con valores de IRPC superiores a seis fueron consideradas positivas.

MUESTRA	VALOR DE IRPC
POSITIVO	> 6,0

Herdcheck®

Herdcheck® es tanto una marca comercial registrada de laboratorios IDEXX, por lo que utilizaremos los términos Herdcheck o IDEXX para referirnos a esta técnica.

Validación del test

Para que el ensayo sea válido, la diferencia entre el promedio del control positivo y el promedio del control negativo tiene que ser mayor o igual que 0.150. Además el promedio del control negativo debe ser menor o igual que 0.20.

Cálculos

Para la interpretación de los resultados se calculó el índice relativo (S/P)

$$S/P = \frac{D.O._{650} \text{ Muestra} - \text{Media } D.O._{650} \text{ Control Negativo}}{\text{Media } D.O._{650} \text{ Control positivo} - \text{Media } D.O._{650} \text{ Control negativo}} \times 100$$

Interpretación de los resultados

Las muestras de suero con valores S/P mayores o iguales a 0.5 fueron consideradas positivas de presencia de hacia los anticuerpos frente *N. caninum*.

1.2. TÉCNICA DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Los sueros de aquellos animales en los que no coincidían los resultados de los dos ELISAS se analizaron con la técnica de IFI para confirmar la presencia o ausencia de IgG de *N. caninum* según fuera el caso.

La técnica IFI empleada utiliza como antígeno taquizoitos NC-1 (VMRD Inc., Washington, DC, EE.UU.). El antisuero utilizado se desarrolló en conejo utilizando IgG bovino purificado como inmunógeno (Rabbit anti-bovine IgG (whole molecule), Sigma) que se conjuga con isocianato de fluoresceína (FITC). Para la dilución de los sueros se utilizó Serum Diluting Buffer (SDB) (Na₂HPO₄, Na₂H₂PO₄, NaCl, BSA, DI/dH₂O) y para los lavados se utilizó 4X FA Rinse buffer (RB) (25mM Na₂CO₃; 100 mM NaHCO₃; 35 mM NaCl, DI/dH₂O).

Procedimiento

Todos los sueros se analizaron en una dilución 1:200 en SDB. El portaobjetos con los sueros se incubaron durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se realizó un lavado con RB por 10 minutos y se añadieron 20 µl de conjugado anti bovino IgG (1:300). Posteriormente se incubó el portaobjetos en las mismas condiciones mencionadas anteriormente hasta su lavado en RB durante 10 minutos. La observación se realizó en un reflector de fluorescencia Olympus BH2. Como control positivo se utilizó el suministrado por el kit y como control negativo se utilizó una solución salina de PBS.

1.3. ELISA DE AVIDEZ

La técnica de Avidéz se basa en el tipo de unión de las IgG durante la infección por *Neospora*, que es más débil al inicio de la infección y más fuerte según avanza la infección por lo que en una infección crónica los títulos de avidéz son mayores que en una infección reciente permitiendo diferenciar entre ambos estadios.

Utilizamos un kit comercial de ELISA indirecto: *Neospora caninum* iscom ELISA (*Neospora*-Ab) (Björkman et al., 1999) de SVANOVIR®, que utiliza el antígeno de *Neospora* incorporado en partículas iscom.

Las muestras de suero y los controles de avidéz se analizaron en dilución 1:100; 1:500, 1:2.500, 1:12500 en duplicado. Los controles positivo y negativo se analizaron en dilución 1:100.

Tras la incubación durante 1 hora a 37°C y posterior lavado con PBS-Tween (PBS-T) se adicionaron 100 µl de urea 6M (en la primera dilución y 100 µl PBS-T en la dilución por duplicado como se indica en el esquema (figura 1.), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan dos lavados y se continuó añadiendo el conjugado y el sustrato según protocolo del kit iscom ELISA (*Neospora* -Ab) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La reacción colorimétrica en cada pocillo se midió utilizando un lector de ELISA (Labsystems) a una longitud de onda de 450nm.

Figura 1. Ejemplo análisis de 10 muestras serológicas mediante ELISA de avidéz.

PBS-T	A.c	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
	1:100										
PBS-T	1:500										
C1	1:2500										
C1	1:12500										
C2	A.c	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
	1:100										
C2	1:500										
C3	1:2500										
C3	1:12500										

A.c: Control de avidéz

S1-S10: nº suero

Urea

Cálculo de los valores de avidéz:

Densidad Optica (DO) corregida =

$$\frac{\text{DO muestra problema}}{\text{DO media del control positivo}}$$

Punto de Corte = $\text{Dilución}_x^{-1} \times 10^3$

$a = \log 5 \times$

$$\frac{\text{DO corregida}_x - 0.2}{\text{DO corregida}_x - \text{DO corregida}_y}$$

0.2= punto de corte

5= factor de dilución

Dilución_x = la mayor dilución con un valor de DO corregida ≥ 0.2

DO_x corregida= DO corregida de la dilución x

OD_y corregida= DO de la siguiente dilución más alta a la dilución x

Índice de Avidéz=

$\frac{\text{Punto de corte con urea}}{\text{Punto de corte sin urea}} \times 100$

Ejemplo

Dilución	DO corregida sin urea				DO corregida con urea			
	1:100	1:500	1:2500	1:12500	1:100	1:500	1:2500	1:12500
K5083	0.821	0.278	0.048	0.001	0.437	0.115	0.009	0.000

Título sin urea

Dilución⁻¹ = 500

$$\text{Log } 5 \times \frac{0.278-0.200}{0.278-0.048} = 0.23704$$

$$\text{Título} = 500 \times 10^{0.23704} = 863$$

Título con urea

Dilución⁻¹ = 100

$$\text{Log } 5 \times \frac{0.437-0.200}{0.437-0.115} = 0.51446$$

$$\text{Título} = 100 \times 10^{0.51446} = 323$$

$$\text{Índice de avidéz} = 323/863 \times 100 = 37$$

Interpretación de los resultados

35<	35-50	>50
Reciente	cuestionable	crónica

2. TÉCNICA DE REACCIÓN DE POLIMERASA EN CADENA (PCR)

Las muestras de DNA se obtuvieron a partir de tejidos de SNC de fetos abortados. Se homogenizó la mitad del cerebro y se obtuvo el DNA a partir de cuatro alícuotas cada una de 0.5-1 gr. de tejido. Los tejidos se lavaron con un buffer de lisis que contenía saponina para eliminar los eritrocitos. Después de la lisis de los eritrocitos la muestra fue incubada en un buffer de proteinasa K (200 µg de proteinasa K/ml) a 37 °C durante unas 10 horas. La proteinasa K se inactivó incubando la muestra a 95°C durante 10 minutos.

La extracción de las muestras se realizó con fenol-cloroformo-isoamyl alcohol (25:24:1). Posteriormente se hizo una segunda extracción con cloroformo-isoamyl alcohol (24:1). El DNA se precipitó con etanol al 100% y tras un lavado con etanol al 70% se resuspendió en 500 µl de Tris-EDTA (TE). La muestra utilizada en la PCR fue de 1 µl DNA por 50 µl de reacción de PCR. La reacción se realizó por duplicado para cada alícuota procesada de DNA.

Para el diagnóstico de *N. caninum* basado en la técnica de PCR se ha seleccionado la región genómica específica Nc5 como la secuencia objetivo de la amplificación de DNA (Kaufmann et al., 1996; Yamage et al., 1996). Los Primers que se han utilizado son Np21-plus y Np6-plus (Liddell et al., 1999). Se realizó un mínimo de dos PCR por cada alícuota, que se procesaron de manera separada. La reacción de PCR se realizó según la descripción de Liddell et al. (1999), con mínimas modificaciones que se describen a continuación. La reacción de PCR de 50 µl va a estar constituida por 10X buffer de PCR, 0.5 µM de cada primer Np21-plus y Np6-plus, 0.2 mM dNTPs y 1.25 unidades de Taq polimerasa (Ecogen, Barcelona, España). La amplificación se va realizar en un aparato de PCR (DNA thermal cycler automatic, (Perkin-Elmer, California, USA). Los ciclos térmicos consistieron en 80°C durante un minuto, 94°C durante cinco minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 45 s) de cebado (63 °C, un minuto) y extensión (74°C, 1,5 min) con una extensión final de 74°C durante 8 minutos.

El producto amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Las muestras de control positivo para *N. caninum* (DNA de taquizoitos de NC-1) fueron cedidas por el Dr. L. M. Ortega (Universidad Complutense de Madrid). Como control negativo se realizaron reacciones de PCR sin DNA para evidenciar la ausencia de contaminaciones en la reacción de PCR.

3 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS Y DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Se emplearon técnicas de histología convencionales con tinción de hematoxilina-eosina y posterior tinción mediante técnicas de inmunohistoquímica para observación de lesiones compatibles con neosporosis en tejidos de fetos abortados, fundamentalmente en cerebro, pero cuando ha sido posible también en pulmón, hígado y corazón. Dichos exámenes se han realizado en la Unidad de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona. Brevemente, para el examen histológico los tejidos en formol se deshidratan, son parafinados y seccionados en 5 µm y posteriormente teñidos con hematoxilina-eosina. En las secciones en las que se apreciaban lesiones en el examen histológico, se procedía a realizar una inmunotinción, según la técnica de Lindsay y Dubey, (1989) utilizando suero policlonal de conejo frente *N. caninum* generosamente cedido por el Dr. Dubey (USDA, Beltsville, MD, USA). En cada procedimiento se han incluido muestras control positivas frente *N. caninum* y muestras control negativas.

REFERENCIAS

- Björkman C, Näslund K, Stenlund S, Mañé S W, Buxton D, Uggla A. 1999. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 41-44.
- Kaufmann H, Yamage M, Roditi I, Dobbelaere D, Dubey JP, Holmdahl OJ, Trees A, Gottstein B. 1996. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol Cell Probes.* Aug. 10.4.289-97
- Lindsay DS, Dubey JP. 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1981-1983.
- Liddell S, Jenkins MC, Dubey JP. 1999. A competitive PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *Int J. Parasitol.* 29.10.1583-1588.
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. 1995. An enzyme-linked immunosorbent (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* spp. infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 352-359

Rebordosa X, Álvarez-García G, Collantes E, Ortega LM, Artigas C. 2000. Desarrollo de un ELISA indirecto para la valoración de anticuerpos contra *Neospora caninum*. Laboratorio Veterinario, Avedida 17, 5-8.

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). J Parasitol. Apr;82.2:272-9.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in North-east Spain. *Journal of Veterinary Medicine B*, 51, 348-352. 2004.

Neospora-associated Abortion Episode over a 1-Year Period in a Dairy Herd in North-east Spain

F. LÓPEZ-GATIUS^{1,4}, M. LÓPEZ-BÉJAR², K. MURUGAYEL¹, M. PABÓN², D. FERRER^{2,3} and S. ALMIRIA^{2,3}

Addresses of authors: ¹Department of Animal Production, University of Lleida, Escola Tècnica Superior de Ingenieria Agraria, Avda. Rovira Roure 177, 25198 Lleida, Spain; ²Department of Anatomy and Animal Health, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; ³Research Centre in Animal Health, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain; ⁴Corresponding author; E-mail: flopez@prodan.udl.es

With 2 tables

Received for publication June 4, 2004

Summary

This report describes a retrospective study based on serological screening, performed on a *Neospora*-associated abortion episode over a 12-month period in a dairy herd in north-east Spain. During the 1-year study period, the overall abortion rate for the herd was 23.2% (38 abortions of 164 diagnosed pregnancies). The data analysed were those derived from blood samples collected from the whole herd ($n = 237$) and from diagnosed pregnancies. Antibodies to *Neospora caninum* were found in 35.4% of the cattle with 44% of seropositive pregnant animals aborting over 1-year period. Based on the odds ratio, the risk of abortion was 12.2 times higher ($P < 0.0001$) in the *Neospora*-seropositive animals than in seronegative animals and significantly higher during the second term of gestation ($P < 0.01$) than during the first and third terms. Abortions were not found to be associated with parity status or season of pregnancy, and the common risk factors associated with pregnancy loss in the geographical area of the study. Age-related differences in *N. caninum* seroprevalence were not statistically significant, indicating vertical transmission as the main route of infection. Indeed, a high percentage of congenitally infected offspring was observed (90.6%) and the farm had been free of dogs for the last 7 years. Our results suggest that, when a dairy herd shows an increased incidence of abortions due to Neosporosis, maternal serology can be a good indicator of the abortion risk in individual cows, and that the effects of factors normally related to abortion, such as parity and pregnancy season, may be masked.

Introduction

Neospora caninum is an obligate intracellular protozoan that can infect domestic and wild canids, ruminants and other warm blooded animal species (Dubey and Lindsay, 1996; Dubey, 1999; Anderson et al., 2000). Abortion and stillbirth as the result of neosporosis, especially in dairy cattle, have been reported worldwide and are significant causes of economic loss in the dairy industry. In Spain, cross-sectional studies have shown the presence of antibodies to *N. caninum* in about one-third of all dairy cattle tested (Mainar-Jaime et al., 1999; Quintanilla-Gozalo et al., 1999). Furthermore, *N. caninum* is identified in 32–57% of aborted bovine foetuses in northern Spain (Gonzalez et al., 1999; Pereira-Bueno et al., 2003).

Both endemic and epidemic abortion patterns have been related to *Neospora* infection in cattle. In the endemic pattern

of abortion, the herd suffers a high abortion rate (from 10 to 17%) that persists for years (Thurmond et al., 1997). The abortion pattern is termed 'epidemic', when a high proportion of pregnant cows abort during a short period of time (Selares et al., 1998; Wouda et al., 1999). The highest figure quoted for *Neospora*-related abortions is over 30% (Anderson et al., 2000). This report describes a retrospective study based on serological screening, performed on a *Neospora*-associated abortion episode over a 12-month period in a dairy herd in north-east Spain. The reproductive history of the herd during the 2 years prior to the study was also analysed.

Materials and Methods

Cattle and herd management

The present study was performed over a 12-month period (1 October, 1999 to 30 September, 2000) in a Holstein-Friesian dairy herd free of dogs for the last 7 years. The cows, reared within the herd, calved all the year round, were kept in open stalls and milked twice daily. The mean annual milk production of the herd for the study period was 9890 kg/cow. All animals were tuberculosis- and brucellosis-free (annual tests from 1985 to 2001) and bovine virus diarrhoea (BVD)-seronegative (biannual tests from 1995 to 2001). Vaccination programmes were not performed between 1995 and 2001. The herd was subjected to a reproductive health programme involving weekly checks. The reproductive tract of each animal was examined by palpation per rectum within 34–40 days post-partum to check for normal uterine involution and ovarian structures. Reproductive disorders diagnosed at this time were treated until resolved or until culling. All the animals were bred by artificial insemination. Pregnancy diagnoses were performed on days 34 and 60 post-insemination by transrectal ultrasound and by palpation per rectum on days 90 and 120. Animals were then subjected to daily observation for signs of abortion until 180 days of pregnancy. Rectal pregnancy diagnoses were finally performed on days 180 and 210. Following a pregnancy diagnosis, abortion was recorded if a subsequent pregnancy diagnosis was negative or when signs of abortion were observed.

Serological diagnosis

In March 2001, blood samples ($n = 237$) were collected from the whole herd excluding calves < 6 months of age to avoid the

presence of colostral antibodies. The blood samples were centrifuged and the sera stored at -20°C until analysis. Sera were tested for antibodies against *N. caninum* using a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Herd check[®] anti-*Neospora*, IDEXX Laboratories, Madrid, Spain) based on the whole tachyzoite lysate of *Neospora* NC-1. The test was performed according to the manufacturer's instructions with a value of 20/50 taken to denote seropositivity.

Histopathology of aborted foetuses

Only two aborted foetuses, from two seropositive cows which aborted during the second trimester of gestation, were submitted for laboratory analysis. We looked for evidence of protozoal lesions in haematoxylin eosin-stained tissue. The presence of *N. caninum* was established by a specific immunohistochemical procedure (Lindsay and Dubey, 1989) and specific *Nc5* polymerase chain reaction (PCR) in brain tissue (Laddell et al., 1999; Almeria et al., 2002).

Statistical analysis

Abortion data were obtained from cows and heifers that were diagnosed pregnant during the study year from the first pregnancy of the current lactation in cows, and from the first pregnancy in heifers. If animals suffering abortion were re-inseminated, subsequent data were discarded. In the geographical area of the study, there are only two clearly differentiated climates: warm (May-September) and cool (October-April) periods. Reproductive parameters are significantly impaired in the warm period (López-Gatius, 2003) and the season of insemination and parity have been significantly correlated with pregnancy loss (Lahérma et al., 1996; López-Gatius et al., 2002). Regression analyses were performed according to the method of Hosmer and Lemeshow (1989) by the logistic procedure (SAS, 2001). Basically, this method involves five steps as follows: preliminary screening of all variables for univariate associations, construction of a full model using all the variables found to be significant in the univariate analysis, stepwise removal of non-significant variables from the full model and comparison of the reduced model with the previous model for model fit and confounding, evaluation of interactions among variables, and assessment of model fit using Hosmer-Lemeshow statistics. Variables with univariate associations showing P -values < 0.25 were included in the initial model. We continued modelling until all the main effects or interaction terms were significant according to the Wald statistic at $P < 0.05$.

Logistic regression analyses were performed on data from each animal, using abortion as the dependent variable and *Neospora* seropositivity, pregnancy season and parity as independent factors. *Neospora* seropositivity, pregnancy in the warm period and parity (parous or non-parous) were considered dichotomous variables, where 1 denotes presence and 0 absence. To analyse the data for vertical transmission, the animals were grouped into families with the same maternal ancestor and all dam-daughter relationships were recorded. The pregnancy period was divided into three trimesters. The distribution of abortions during the pregnancy period, age-related seroprevalence and vertical transmission were analysed using chi-squared or Fisher's exact tests.

Results

Data from 132 diagnosed pregnancies in parous cows and from 32 diagnosed pregnancies in heifers corresponding to the 12-month period of the study were analysed. The overall abortion rate for the herd was 23.2% (38 of 164 diagnosed pregnancies). Of the 38 animals undergoing abortion, 29 (76.3%) were *N. caninum* seropositive (Table 1). Seropositive animals aborted throughout the study period: nine, six, eight and six abortions were registered for every consecutive 3 months of the year, respectively. Both foetuses submitted to laboratory analyses showed lesions and were found to be infected by *Neospora*.

The presence of *N. caninum* antibodies in the animals was the only variable included in the final logistic regression model for abortion. *Neospora caninum* infection increased the probability of abortion by an odds ratio of 12.2 ($P < 0.0001$, 95% confidence interval 1.9-39.3, standard error = 0.46, likelihood ratio test = 38.03, 1 d.f., $P < 0.0001$). Parity and season of pregnancy had no effect on abortion. While 30 of 132 (22.7%) parous females aborted, eight of 32 (25%) heifers aborted (Table 1). Sixty-six animals became pregnant in the warm period and, of these, 16 (24.2%) aborted. In the cool period, 98 animals became pregnant, 22 of which (22.5%) aborted.

The numbers of *Neospora* seropositive animals that aborted during the first, second and third trimester of pregnancy were 2 (6.9%), 20 (69.0%) and 7 (24.1%) respectively. The abortion rate during the second trimester was significantly higher ($P < 0.0001$) than those recorded for the first and third trimesters. In three dams, a mummified foetus was detected during the pregnancy check performed on day 180. The foetuses were approximately 5 months old and these cows were registered as having aborted during the second trimester of pregnancy.

The overall seroprevalence of *N. caninum* infection in the herd, including calves over 6 months of age, was 35.4% (84 seropositive animals of 237) and almost 44% of seropositive pregnant animals aborted (29 of 66, Table 1). Analysis of seroprevalence in relation to age showed no statistically significant differences in the distribution of seropositivity across the age groups (Table 2). No high seroprevalence age groups were detected in the herd. A strong association was noted between the serostatus of dams and their progeny. Of 32 seropositive cows with descendants in the herd at the time of sampling, 29 seropositive cows had 40 seropositive descendants and no seronegative offspring, while the remaining three

Table 1. Abortion and *Neospora* seropositivity rates according to parity status of the diagnosed pregnant animals in a dairy herd with an increased incidence of abortions over 1-year period*

	n	Seropositive (%)	Total no of abortions (%)	Seropositive aborting animals (%)
Overall	164	66 (40) ^b	38 (23) ^b	29 (44) ^c (73) ^d
Parous cows	132	50 (38) ^b	30 (23) ^b	21 (42) ^c (70) ^d
Heifers	32	16 (50) ^b	8 (25) ^b	8 (50) ^c (100) ^d

*Serological diagnosis was performed 6 months after the end of the year of study.

^bWith respect to the total number of animals.

^cWith respect to the total number of seropositive animals.

^dWith respect to the total number of abortions.

Table 2. Age seroprevalence in a dairy herd with a high incidence of abortions (44% of seropositive animals) over 1-year period

Age group	n	Seropositivity (%) ^a
< 1 year	62	13 (21)
1–2 years	38	16 (42.1)
3–4 years	46	20 (43.5)
5–6 years	33	13 (39.4)
> 6 years	58	22 (37.9)

^aNo significant differences were detected by the chi-squared test (proportions compared in a 2 × 5 contingency table).

seropositive cows had four seronegative calves. Thus, 90.6% of the seropositive dams had seropositive offspring and 90.9% of the calves born to the 32 seropositive dams were seropositive. Of note, was the birth of three seropositive offspring to three seronegative dams. In these dam-daughter pairs in which serology was not concordant, a second blood sample was taken some months later to check for false-positive or negative results. In two of the three dam-daughter pairs, initial results were confirmed, while the remaining dam and daughter were seronegative.

Ten eligible families with the same maternal ancestor were inferred from the available data. In three of these families, seropositive dams gave birth to seropositive offspring on more than one occasion and in five of the families, seropositive dams transmitted *Neospora* infection to at least two generations. However, a small decrease in the percentage of congenital infection was observed with increasing parity of the mother. Seropositive heifers had 88.9% congenitally infected offspring, while in older cows (over four lactations) 75% of the offspring were congenitally infected.

Reproductive history of the herd

In the 2 years before the abortion outbreak, 11.5 and 10.0% of cattle had aborted, respectively, and more than 90% of these abortions had occurred before 90 days of pregnancy. The proportion of *Neospora* positive animals that had aborted during the 2 years preceding the study was 9.3% (seven abortions in 75 *Neospora*-positive animals in the herd), a similar abortion rate to that recorded in seronegative animals (11.1%, 12 abortions in 108 *Neospora* negative animals). The culling rate for these 2 years was 22% parous cows.

Discussion

Subjecting a whole herd to a single serological screening has been described as a rapid and valid method of analysing *N. caninum* infection in terms of routes of transmission, age distribution and pedigree (Dijkstra *et al.*, 2003). Using this approach, we observed a strong association between *N. caninum* seropositivity and abortion, in agreement with previous reports (Dubey *et al.*, 1997; Paré *et al.*, 1997; Moen *et al.*, 1998; Majumdar-Jain *et al.*, 1999; Stenlund *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2003). Our findings indicate that abortion was 12.2 times more likely in *N. caninum*-seropositive than seronegative females. The fact is that this dairy herd showed an extremely high abortion rate among seropositive animals (43.9%), this being the highest figure reported for *Neospora*-related abortions followed by the 30% rate reported by Anderson *et al.* (2000). The abortion rate in the years previous

to the outbreak (most abortions occurring before 90 days of pregnancy) is considered endemic and not related to infectious causes in our geographical area of study (López-Gatius *et al.*, 2002, 2004).

Although infection was confirmed only in two aborted fetuses, this significant increase in risk of abortion among seropositive cows indicated a causal link between *N. caninum* infection and abortion and has been previously noted by us in another study in our area (López-Gatius *et al.*, 2004) as well as by other authors (Dubey *et al.*, 1997; Paré *et al.*, 1997; Moen *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 2003).

Our results indicated that parity and season had no effect on the abortion rate in this herd. Parity status (heifer versus cow) and season of pregnancy have previously been found to be the major risk factors for abortion in this geographical area (Lahérria *et al.*, 1996). This might suggest that the effects of management factors generally related to abortion are masked when a dairy herd suffers an outbreak of abortions due to neosporosis. The abortion rate in *Neospora*-seropositive animals was significantly higher during the second gestation term, the number of seropositive animals that aborted during the first term being very low. Although in most reports the gestational age of *Neospora*-infected fetuses was from 3 months of gestation to term (Barr *et al.*, 1991; Wouda *et al.*, 1997; Hattel *et al.*, 1998), the effect of *N. caninum* infection in cattle during the first trimester of pregnancy is an aspect of the biology of this parasite that is not clearly understood. In a recent study (López-Gatius *et al.*, 2004) based on data from 2773 pregnant animals (15% seropositive), we were unable to link seropositivity prior to pregnancy with pregnancy loss in the first term of pregnancy, yet did observe a very significant association between *N. caninum* seropositivity and abortion in animals aborting after 90 days of pregnancy.

The present abortion problem was probably not related to a point source of infection. The strong correlation between the serological status of dams and daughters, as observed by others (Paré *et al.*, 1996; Schares *et al.*, 1998; Wouda *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 1999; Dijkstra *et al.*, 2001; Campero *et al.*, 2003; Piergeli Fioretti *et al.*, 2003), indicated that vertical transmission was the predominant transmission route in the herd. A few mismatches in dam-daughter serostatus were observed suggesting some degree of post-natal transmission in this herd. A low rate of post-natal infection, i.e. < 8.5%, has been reported in longitudinal studies (Paré *et al.*, 1997; Davison *et al.*, 1999). The distribution of seropositive animals across the different age groups was not statistically significant. The apparent decrease (not significant) in the seroprevalence rate shown by animals under 1 year of age could be explained by the drastic reduction in the number of calves borne by the seropositive pregnant animals during the study period. Infection was therefore most probably perpetuated by vertical or congenital transmission before the onset of the abortion episode, as observed by Wouda *et al.* (1999).

Although abortion rates were considered endemic during the 2 years prior to the study, there was a significant annual increase in the abortion rate. The abortion episode appeared to be triggered by factors promoting latent infection by immune suppression in a number of animals, rather than being the result of a recent introduction, in agreement with results described by Wouda *et al.* (1999) and Atkinson *et al.* (2000). Abortion as the result of *Neospora*-infection has been described as multi-causal and infection *per se* might not be

sufficient to cause abortion (Paré et al., 1997). Factors such as maternal antibody levels during gestation (Paré et al., 1997), concurrent viral infections such as BVD (Björkman et al., 2000), hereditary factors (Björkman et al., 1996), immunosuppressive agents or even the use of mouldy maize-silage as feed (Bartels et al., 1999) might contribute to the risk of abortion in *Neospora*-infected animals. Some *N. caninum*-associated abortion outbreaks have even been related to a limited period of common housing and feeding of the animals and in several cases to the introduction of a new dog on the farm \leq 5 years before the first *Neospora*-associated abortions (Dijkstra et al., 2002). This was not the case in our study, in which no animals were housed or fed as separate groups, and the farm had been free of dogs for the last 7 years, although dogs or wild canids in the neighbourhood, such as red foxes, cannot be excluded as a possible source of infection through contamination of the feeding alley or storage areas.

Our results suggest that, in an increased incidence of abortions because of neosporosis in dairy cattle, maternal serology can be a good indicator of abortion risk and that abortion-linked management factors, such as parity and pregnancy season, may be masked.

Acknowledgements

The authors thank Dr J. P. Dubey for helpful review of this manuscript and Ana Burton for assistance with the English translation. This study received financial support from the Spanish CICYT grant AGL2000-0904.

References

Almeria, S., D. Ferrer, M. Pabón, J. Castilla, and S. Mañás, 2002. Red foxes (*Falco vulpes*) are a natural intermediate host of *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 107, 287–294.

Anderson, M. L., A. G. Andriamanisoa, and P. A. Conrad, 2000. Neosporosis in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60–61, 417–431.

Atkinson, R. A., R. W. Cook, L. A. Reddacliff, J. Rothwell, K. W. Bready, P. Harper, and J. F. Ellis, 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Aust. Vet. J.* 78, 262–266.

Barr, H. C., M. L. Anderson, J. P. Dubey, and P. A. Conrad, 1991. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet. Pathol.* 28, 110–116.

Bartels, C. J. M., W. Wouda, and Y. H. Schukken, 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52, 247–257.

Björkman, C., O. Johansson, S. Stenlund, O. J. M. Holmdahl, and A. Ugglå, 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1441–1444.

Björkman, C., S. Alenius, U. Emanuelsson, and U. Ugglå, 2000. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet. J.* 159, 201–206.

Campero, C. M., D. P. Moore, H. Ligonarino, A. C. Odion, M. Castro, and H. Viscu, 2003. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. *J. Vet. Med. B* 50, 455–460.

Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees, 1999. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally-calving cattle and aborting cattle. *Int. J. Parasitol.* 29, 1189–1194.

Dijkstra, T. H., H. W. Barkema, M. Eysker, and W. Wouda, 2001. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31, 209–215.

Dijkstra, T. H., H. W. Barkema, J. W. Hesselink, and W. Wouda, 2002. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet. Parasitol.* 105, 89–98.

Dijkstra, T. H., H. W. Barkema, M. Eysker, M. L. Berboer, and W. Wouda, 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.* 110, 161–169.

Dubey, J. P., 1999. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214, 1160–1163.

Dubey, J. P., and D. S. Lindsay, 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67, 1–59.

Dubey, J. P., M. C. Jenkins, D. S. Adams, M. McCallister, R. Anderson-Sprecher, T. V. Barsler, O. C. H. Kwok, N. C. Lally, C. Björkman, and A. Ugglå, 1997. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Parasitol.* 83, 1063–1069.

González, L., D. Buxton, R. Añazarán, G. Adriza, S. Moley, and J. C. Marco, 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet. Rec.* 144, 145–150.

Hanel, A. L., M. D. Castro, J. D. Gumma, D. Weinstock, J. A. Reed, and J. P. Dubey, 1998. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet. Parasitol.* 74, 307–313.

Hosmer, D. W., and S. Lemeshow, 1989. *Applied Logistic Regression*. Wiley, New York.

Laherra, J., F. Lopez-Gatius, P. Santolana, M. Lopez-Bejar, and J. Rullant, 1996. Influence of management factors on pregnancy abortion in dairy cattle. *Theriogenology* 45, 1247–1253.

Liddell, S., M. C. Jenkins, and J. P. Dubey, 1999. A comparative PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1583–1588.

Lindsay, D. S., and J. P. Dubey, 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1981–1983.

López-Gatius, F., 2003. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 60, 89–99.

Lopez-Gatius, F., P. Santolana, J. Yanz, J. Rullant, and M. Lopez-Bejar, 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology* 57, 1251–1261.

Lopez-Gatius, F., M. Pabón, and S. Almeria, 2004. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 62, 606–613.

Munoz-Jume, R. C., M. C. Thurmond, B. Bernal-Huerta, and S. K. Hietala, 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet. Rec.* 145, 72–75.

Moën, A. R., W. Wouda, M. F. Mul, E. A. M. Graat, and T. Vanwerven, 1998. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 49, 1301–1309.

Moore, D. P., C. M. Campero, A. C. Odion, R. Chayer, and M. A. Bianco, 2003. Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. *J. Vet. Med. B* 50, 304–308.

Paré, J., M. C. Thurmond, and S. K. Hietala, 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60, 133–139.

Paré, J., M. C. Thurmond, and S. K. Hietala, 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83, 82–87.

Pereira-Bueno, J., A. Quintanilla-Gozal, V. Perez-Perez, A. Espu-Felgueroso, G. Alvarez-Garcia, E. Cullinanes-Fernandez, and L. M. Ortega-Mora, 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 111, 143–152.

Pierpioli-Finetti, D., P. Pasquati, M. Diarferia, V. Mangili, and L. Rovagnoli, 2003. *Neospora caninum* infection and congenital

- transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth generation. *J. Vet. Med. B* **50**, 399-404.
- Quintanilla-Gonzalo, A., J. Perera-Buena, E. Tahares, E. A. Innes, R. Gonzalez-Panella, and I. M. Ortega-Mora, 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle and beef cattle in Spain. *Int. J. Parasitol.* **29**, 1201-1208.
- SAS, 2001. Technical Report. Release 8.2. SAS Institute Inc, Cary, NC.
- Schaes, G., M. Peters, R. Wurm, A. Barwald, and F. J. Conraths, 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet. Parasitol.* **80**, 87-98.
- Stehul, S., H. Kindahl, U. Magnusson, A. Uggla, and C. Bjorkman, 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* **85**, 227-234.
- Thurmond, M. C., S. K. Hietala, and P. C. Blanchard, 1997. Herd-based diagnosis on *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J. Vet. Diag. Invest.* **9**, 44-49.
- Wouda, W., A. R. Meen, J. J. Visser, and K. Vanknapen, 1997. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organism in brain, heart and liver. *J. Vet. Diag. Invest.* **9**, 180-185.
- Wouda, W., A. R. Meen, and Y. H. Schukken, 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* **49**, 1311-1316.
- Wouda, W., C. J. M. Bartels, and A. R. Meen, 1999. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology* **52**, 233-245.

CPITULO II. . *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy. 2004.

Theriogenology, 62, 606-613.



Neospora caninum infection does not affect early pregnancy in dairy cattle

F. López-Gatius^{a,*}, M. Pabón^b, S. Almería^b

^aDepartment of Animal Production, University of Lleida, Lleida, Spain

^bDepartment of Anatomy and Animal Health,

Autonomous University of Barcelona, CRESA, Barcelona, Spain

Received 5 October 2003; received in revised form 8 November 2003; accepted 9 November 2003

Abstract

This study was designed to evaluate the relationship between *Neospora caninum* infection prior to pregnancy, as determined through maternal serology, and the subsequent occurrence of abortion in dairy cattle. Special emphasis was placed on pregnancy losses in the first trimester of pregnancy. *Neospora caninum* antibodies were analyzed by commercial ELISA in 2773 pregnant animals (2022 parous cows and 751 heifers) from six herds. The mean seroprevalence of antibodies to *N. caninum* in the herds was 15.1% ($n = 419$). From gestation Day 34 to the 90th day of pregnancy, there were 183 abortions (6.6% of all pregnancies) (23 in *Neospora* positive animals). After 90 days of pregnancy, the number of abortions was 146 (5.3%); 126 occurring during the second and 20 during the third trimester of pregnancy (105 in *Neospora* positive animals). Multiple logistic regression analyses were performed on data from each animal using abortion before or after 90 days of pregnancy as the dependent variable, and *Neospora* positivity, herd, pregnancy season, and parity (parous or non-parous) as independent factors. No significant effects of *Neospora* positivity and herd were found on the abortion rate before 90 days of pregnancy. Based on the odds ratio, the abortion rate was 4 times higher ($P < 0.0001$) in animals that became pregnant in the warm than in the cool period, and 3.7 times higher ($P < 0.0001$) in parous than in nonparous animals. *Neospora* positivity was the only variable included in the logistic regression model for abortions occurring after 90 days of pregnancy. Seropositivity in an animal increased the probability of abortion by an odds ratio of 18.9 ($P < 0.0001$; 95% confidence interval 12.9–27.8). Season, parity, and herd showed no effect. The results of the present study suggest that chronic *N. caninum* infection prior to pregnancy appears not to affect the early fetal period, but does have a significant abortive effect after 90 days of gestation.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Neospora caninum*; Abortion; Dairy cattle; Serology; Early pregnancy

* Corresponding author. Tel.: +34-973-702-500; fax: +34-973-238-264

E-mail address: lopez@prodan.udl.es (F. López-Gatius).

1. Introduction

For dairy producers, abortion is probably the single most important reproductive disorder, its effects being greater if pregnancy loss occurs between 30 and 90 days of gestation [1]. Early fetal loss often escapes clinical diagnosis, and early pregnancy losses are assumed to be of a multifactorial origin. The risk of early fetal loss increases in intensive dairy management systems [2]. *Neospora caninum*, an obligate intracellular protozoon that infects domestic and wild canids, ruminants, and horses, has a wide geographical distribution and is responsible for substantial economic losses, inducing abortion and stillbirth in cattle [3,4]. In Spain, bovine neosporosis was first diagnosed by Fondevila et al. [5] and has since been recognized as a leading cause of abortion in cattle. Antibodies to *N. caninum* were detected in about one third of all dairy cattle tested [6,7] and *N. caninum* was identified in 32–57% of all aborted bovine fetuses in northern Spain [8].

Neospora caninum-infected cows show a very high rate of transplacental transmission. This rate has been estimated to be as high as 95% [9]. The majority of calves born from infected mothers are clinically normal, but are infected for life. A seropositive cow is more likely to abort than a seronegative cow [9–12], to the extent that prospective serological examination of dairy herds could be a significant predictor of both congenital infection and abortion [13].

The gestational age of aborted *Neospora*-infected fetuses has been found to range from 3 months of gestation to term [14–18], and the incidence of *N. caninum*-associated abortion in fetuses peaks in the 5th to 7th month of gestation [14,17,19]. Though in field conditions, abortions occurring before 3 months of pregnancy are rarely ascribed to *N. caninum*, early *N. caninum* abortion may be missed by the farmer and therefore not evaluated by the diagnostic laboratories. Hence, the effects of *N. caninum* infection in cattle during the first trimester of pregnancy are not yet clearly understood.

The present study was based on a prospective analysis of *N. caninum* antibodies in dairy cows from herds suffering endemic abortions. We evaluated the relationship between the presence of antibodies to *N. caninum* prior to pregnancy and subsequent abortion before or after 90 days of pregnancy. The effects of *N. caninum* infection and management variables previously found to be significantly correlated with early fetal loss in the same area were also analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Our study was performed over a 2-year period (1 June 2001 to 31 May 2003) on six commercial dairy herds in northeastern Spain. The six herds comprised a total of 3600 mature Holstein–Friesian cows. All the farms had similar management practices and high milk production. Mean annual milk production by the herds was 10,400 kg per cow. The cows, grouped according to their milk production, were milked three times daily, fed complete rations, and kept in open stalls. Mean herd size was 750 animals and ranged from 150 to 1250 mature cows. The culling rate in the herds for the study period was 20–33% (mean 29%).

From 0 to 300 days after serological analysis, 2022 pregnancies were diagnosed in parous cows and 751 in heifers. All these animals were included in the study. All the animals had been bred by artificial insemination and were tuberculosis- and brucellosis-free.

2.2. Serological tests

Blood samples were collected from 3400 animals in the six herds. From June 2001 to February 2002, all the animals were sampled, herd by herd, with the exception of calves less than 6 months of age to avoid colostral antibodies. The serum was separated from each blood sample by centrifugation and 1 ml aliquots of serum were stored at -20°C until the time of analysis. The sera were tested for *N. caninum*-specific antibodies using two commercial ELISA kits based on the whole tachyzoite lysate of *Neospora* NC-1, according to the manufacturers' instructions (Herd checkTM anti-*Neospora*, IDEXX Laboratories, Madrid, Spain; CIVTESTTM, Hypra, Girona, Spain). A cut-off value ≥ 0.50 was taken as a positive test result. An animal was considered to be seropositive when at least one of the two tests proved positive.

Seroconversion and the probability of horizontal transmission occurring in the herds during the study period was evaluated by collecting a second blood sample from 500 seronegative and 250 seropositive animals selected at random between 6 and 12 months after the first blood sample was taken.

2.3. Pregnancy and abortion diagnoses

Pregnancy diagnosis was performed on Day 34 of pregnancy by transrectal ultrasound, and on Days 90, 120, and 180 by palpation per rectum. Following a pregnancy diagnosis on Day 34, abortion was recorded in the case of a subsequent negative pregnancy diagnosis or when signs of abortion were observed. Animals were subjected to practically daily observation for signs of abortion from Day 120 of pregnancy until parturition. Abortion data were obtained for the first pregnancy of the current lactation in cows, and for the first pregnancy of heifers.

Only two 5-month-old aborted fetuses were submitted for laboratory analysis and both were found to be infected by *Neospora* in the absence of other causes of abortion (data not shown).

2.4. Data collection and analysis

Data on *Neospora* seropositivity, abortion, and management variables, such as herd, parity (parous or heifers), and season of insemination, were recorded for each pregnant animal. In the geographical area of study there are only two clearly differentiated meteorological periods; warm (May to September) and cool (October to April). Reproductive parameters are generally significantly impaired in the warm period [20], and the season of insemination and pregnancy loss have been significantly correlated [21,22]. For this reason, insemination dates were used to analyze the effect of the season of insemination (warm versus cool period) on the occurrence of abortion.

We determined levels of agreement between serological tests (Kappa statistics). The relative contribution of each factor to the probability of a cow undergoing abortion before or after 90 days of pregnancy was determined by logistic regression. Abortion before or after 90 days of pregnancy was considered as the dependent variable, and *Neospora* seropositivity, parity, and insemination in the warm period were included as dichotomous variables (1 = presence, 0 = absence). The herd was coded as a class variable.

Regression analyses were performed according to the method of Hosmer and Lemeshow [23] by the logistic procedure [24]. Basically, this method involves five steps as follows: preliminary screening of all variables for univariate associations; construction of a full model using all the variables found to be significant in the univariate analysis; stepwise removal of nonsignificant variables from the full model and comparison of the reduced model with the previous model for model fit and confounding; evaluation of interactions among variables; and assessment of model fit using Hosmer-Lemeshow statistics. Variables with univariate associations showing *P*-values <0.25 were included in the initial model. We continued modeling until all the main effects or interaction terms were significant according to the Wald statistic at *P* < 0.05.

The percentages of seropositive animals that aborted during the first, second, or third trimester of pregnancy were finally compared using the Chi-squared test. Values are expressed as the mean ± standard deviation (S.D.).

3. Results

The two ELISA techniques showed a Kappa value of 0.94 (0.90–0.96), indicating a very high level of agreement between the tests. The seroprevalence of *N. caninum* antibodies in the herds was 35.1% (Table 1) and ranged from 3.3 to 35.9%. In total, 419 animals were recorded as seropositive. Overall, 250 seropositive animals in which a second analysis was performed between 6 and 12 months after the first sample continued to be seropositive, while of the 500 seronegative animals in which the a second analysis was performed, only 2 were found to be seropositive. This indicates a null or very low incidence of seroconversion or horizontal transmission during the study period.

The mean lactation number for parous cows was 2.3 ± 1.1 and ranged from 1 to 12 lactations. One thousand one hundred and twenty-five (40.6%) pregnancies were recorded in the warm and 1648 (59.4%) in the cool period. Table 1 shows seropositive *Neospora* results and abortion rates for parous and nonparous animals. In 165 parous cows (20

Table 1
Rates* of abortion and *Neospora* seropositivity in pregnant heifers and parous cows

	<i>n</i>	Seropositivity	Abortions	Seropositive animals undergoing abortion
Heifers	751	83 (11.1)	43 (5.7)	24 (28.9)
Parous cows	2022	336 (16.6)	286 (14.1)	104 (31)
Overall	2773	419 (15.1)	329 (11.9)	128 (30.5)

n: number of pregnancies.

* Percentages in parentheses.

Table 2
Odds ratios of variables included in the final logistic regression models for abortions

Factor	Class	n	Odds ratio	95% confidence interval		P
Abortion before gestation Day 90 ^a						
Season	0	1648				
	1	1125	4	2.9	5.6	<0.0001
Parity	0	751				
	1	2022	3.7	3.3	6.1	<0.0001
Intercept			0.011			<0.0001
Abortion after gestation Day 90 ^b						
Seropositivity	0	2194				
	1	396	18.9	12.9	27.8	<0.0001
Intercept			0.019			<0.0001

^a Likelihood ratio test = 1237.5, 2 d.f., $P < 0.0001$. Hosmer and Lemeshow goodness-of-fit test = 1.75, 2 d.f., $P = 0.42$ (the model fits).

^b Likelihood ratio test = 865.6, 1 d.f., $P < 0.0001$.

Neospora positive) and 18 heifers (3 *Neospora* positive), 183 abortions (6.6%) were recorded from gestation Day 34 to the 90th day of pregnancy. The remaining 146 abortions were registered after 90 days of pregnancy (126 during the second and 20 during the third trimester of pregnancy) in 121 cows (84 *Neospora* positive) and 25 heifers (21 *Neospora* positive). Table 2 shows the variables included in the final logistic models for abortions occurring before and after Day 90 of pregnancy, respectively. No significant interactions were found ($P > 0.1$). The logistic regression analysis for abortion before Day 90 of pregnancy indicated no significant effects of the presence of antibodies against *N. caninum* or the herd. However, based on the odds ratios, the abortion rate was 4 times higher ($P < 0.0001$) in animals that became pregnant in the warm than in the cool period, and 3.7 times higher ($P < 0.0001$) in parous than in nonparous animals. Moreover, *Neospora* positivity was the only variable included in the logistic regression model for abortions suffered after 90 days of pregnancy: a positive blood test increased the probability of abortion by an odds ratio of 18.9 ($P < 0.0001$). Season, parity, and herd showed no effect.

The number of *Neospora* positive animals that aborted during the first, second, and third trimester of pregnancy were 23, 100, and 5 (12.6, 79.4, and 25% of the total number of abortions in each trimester, respectively). The abortion rate in seropositive animals during the second trimester (25.3%) was significantly higher (Chi-squared test; $P < 0.0001$) than rates recorded for the first (5.5%) and third (1.7%) terms (percentages of the total number of seropositive animals). In five dams, a mummified fetus was detected during pregnancy diagnosis performed on Day 180. These cows were registered as having aborted during the second trimester of pregnancy.

4. Discussion

Abortion is defined as the termination of pregnancy between Days -12 and 260 of gestation. The embryonic period of gestation extends from conception to the end of the

differentiation stage (about 42 days), and the fetal period runs from Day 42 to parturition [25]. Most non-infectious pregnancy losses occur during the early embryonic period [1], and early fetal death per diagnosed pregnancy can exceed 12% [26,27]. In a previous study [21], we evaluated the effects of management factors on late embryonic and early fetal loss (pregnancy loss following pregnancy diagnosis) in 4212 diagnosed pregnancies: the effects parity status and season were found to be significant. The present results are consistent with those findings since *N. caninum* infection had no effect, and parity and season were the main factors associated with pregnancy loss up until 90 days of gestation. However, 71.9% of the animals that aborted after 90 days of pregnancy had shown a positive blood test. Our results suggest that *N. caninum* infection fails to affect the early fetal period in animals infected before pregnancy.

This lack of effect has two possible explanations. The first is that, in the early stages of pregnancy, the tachyzoites may not have attained sufficient numbers in the placenta and/or fetus to cause damage, but are able to harm the fetus later on in gestation after further replication. The second explanation is that the sudden migration of the protozoa into the bloodstream at mid-gestation might increase the chances of their detection at that time. Long and Baszler [28] were unable to identify tachyzoites in placental and fetal tissues during the pre- and early pregnancy stages in mice experimentally infected with *Neospora*, but could detect them in late mid-gestation.

On the other hand, we observed a close association between *N. caninum* seropositivity and abortion in animals that aborted after 90 days of pregnancy. These results add strength to previously published data on *Neospora* abortion [11,13,29,30] and highlight the consistency of *Neospora* pathogenesis in conditions of different management systems and environments worldwide. According to the odds ratio, abortion was 18.9 times more likely ($P < 0.0001$) to occur in *N. caninum* seropositive than in seronegative females during this period. This increased risk of abortion among seropositive cows points to a causal link between natural *N. caninum* infection and abortion in the herds examined here. Maternal antibody levels during gestation are able to predict congenital infection of calves and abortion of fetuses in infected cows [13]. Furthermore, the occurrence of abortion in seropositive animals was significantly higher during the second trimester of gestation and lower during the third trimester. In a previous prospective study [13], *N. caninum* seropositive animals aborted from 123 to 170 days; mean survival of the aborted fetuses was 147 days, and a reduced percentage of aborted fetuses were *N. caninum* positive beyond 6 months of pregnancy. Thus, it seems that it is during the second trimester that *N. caninum* infection can give rise to the highest rate of abortion in chronically infected dairy cattle. During the second trimester, downregulation of the cellular immune response [31], or failure of the dam to produce an adequate immune response, rather than the already functional fetal immune response, appears to be critical for fetal survival [13,32]. Although when diagnosing abortion serologic data need to be interpreted with caution [3,4], our results suggest that the presence of *N. caninum* antibodies in dairy cows prior to pregnancy can be a predictor of abortion after 90 days of pregnancy.

It is unclear why many cows identified as infected before pregnancy did not abort. Indeed, over 69% of the seropositive cows in this study did not abort. *Neospora caninum* abortion is thought to be multicausal. While infection with the protozoon is necessary for *N. caninum* to induce abortion, infection per se is not sufficient to cause abortion [13].

Factors such as maternal antibody levels during gestation [13], viral infections such as BVD [33], immunosuppressive effects such as those induced by ingesting moldy maize-silage [34], or hereditary factors [35], appear to contribute to the risk of abortion in *Neospora*-infected animals. Yet, a further factor possibly related to an increased risk of *N. caninum*-associated abortion in dairy cattle after 90 days of pregnancy is the high metabolic stress suffered by high production animals.

Although infection was only confirmed in two aborted fetuses, our prospective design allowed us to assess causality and to draw the conclusion that the risk period for abortion was beyond 90 days of pregnancy. As a whole, our results suggest that *N. caninum* infection in animals chronically infected prior to pregnancy does not seem to affect the early fetal period, yet it does appear to have a significant abortive effect after 90 days of gestation.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. I.C. Gasbarre for a helpful review of this manuscript, Paqui Homar for assistance with the data collection, and Ana Burton for assistance with the English translation.

This study received financial support from the Spanish CICYT Project AGL2000-0904.

References

- [1] Vanrose G, de Kruif A, Van Soest A. Embryonic mortality-pathogen interactions. *Anim Reprod Sci* 2000;60/61:131–43.
- [2] Perrar AL, Gay JM, Hancock DD. The frequency of endemic fetal loss in dairy cattle: a review. *Theriogenology* 1995;43:989–1000.
- [3] Dubey JP. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *JAVMA* 1999;214:1160–3.
- [4] Anderson ML, Antibrunano AG, Conrad PA. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci* 2000;60/61:417–31.
- [5] Fundevila D, Añor S, Puntarola M, Dubey JP. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. *Vet Parasitol* 1998;77:187–9.
- [6] Mainar-Jaime RC, Thurnmond MC, Berzal-Herranz B, Hietala SK. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet Rec* 1999;145:72–5.
- [7] Quintanilla-Gonzalo A, Pereira-Buena J, Tabares E, Innes EA, Gonzalez-Paniello L, Ortega-Mora M. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle and beef cattle in Spain. *Int J Parasitol* 1999;29:1201–8.
- [8] Gonzalez L, Buxton D, Alzaerandui R, Aduriz G, Maley S, Marco JC. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Northern Spain. *Vet Rec* 1999;144:145–50.
- [9] Davison HC, Oster A, Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol* 1999;29:1683–9.
- [10] Anderson ML, Palmer CW, Thurnmond MC, Pascanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, et al. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *JAVMA* 1995;207:1206–10.
- [11] Moen AR, Wouda W, Mul MF, Grant EAM, van Wierven L. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 1998;49:1301–9.
- [12] Hietala SK, Thurnmond MC. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serological responses in two dairies. *Int J Parasitol* 1999;29:1669–76.

- [13] Pare J, Thurmond MC, Hietala SK. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol* 1997;83:82–7.
- [14] Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *JAVMA* 1991;198:241–4.
- [15] Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA. *Neospora*-like protozoan infections associated with bovine abortions. *Vet Pathol* 1991;28:110–6.
- [16] Oter A, Jeffrey M, Griffiths IB, Dubey JP. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Vet Rec* 1995;136:602–6.
- [17] Wouda W, Moen AR, Vusser JJ, van Knapen F. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J Vet Diagn Invest* 1997;9:180–5.
- [18] Hattel AL, Castro MD, Guzman JD, Weinstein D, Reed JA, Dubey JP. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet Parasitol* 1998;74:307–13.
- [19] Thornton RN, Thompson EJ, Dubey JP. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *NZ Vet J* 1991;39:129–33.
- [20] López-Gatius F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 2003;60:89–99.
- [21] Lahera J, López-Gatius F, Santolana P, López Béjar M, Rutllani J. Influence of management factors on pregnancy attrition in dairy cattle. *Theriogenology* 1996;45:1247–53.
- [22] Lopez Gatius F, Santolana P, Yáñez J, Rutllani J, López Béjar M. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology* 2002;57:1251–61.
- [23] Hosmer DW, Lemeshow S. Applied logistic regression. New York: Wiley, 1989.
- [24] SAS Technical report release 8.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2001.
- [25] Committee on Bovine Reproductive Nomenclature. Recommendations for standardizing bovine reproductive terms. *Cornell Vet* 1972;62:216–37.
- [26] Day JD, Weaver LD, Frann CE. Twin pregnancy diagnosis in Holstein cows: discriminatory powers and accuracy of diagnosis by transrectal palpation and outcome of twin pregnancies. *Can Vet J* 1995;36:93–7.
- [27] Markusfeld Nir O. Epidemiology of bovine abortions in Israeli dairy herds. *Prev Vet Med* 1997;31:245–55.
- [28] Long MT, Baszler TV. Fetal loss in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *J Parasitol* 1996;82(4):608–11.
- [29] Dubey JP, Jenkins MC, Adams DS, McAllister M, Anderson Sprecher R, Baszler TV, et al. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J Parasitol* 1997;83:1063–9.
- [30] Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. Herd based diagnosis of *Neospora caninum* induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diagn Invest* 1997;11:90–4.
- [31] Innes EA, Wright S, Maley S, Rae A, Karar E, Bartley P, et al. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 2001;31:1523–34.
- [32] Osburn BI, MacLachlan NJ, Terrel TG. Ontogeny of the immune system. *JAVMA* 1982;181:1049–52.
- [33] Björkman CS, Alenius S, Emanuelsson U, Uggla A. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet J* 2000;159:201–6.
- [34] Banel CJM, Wouda W, Schukken YH. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 1999;52:247–57.
- [35] Björkman CS, Johansson O, Stenlund S, Holmndahl ÖJM, Uggla A. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *JAVMA* 1996;208:1441–4.

CAPÍTULO III. Diagnóstico serológico de la infección por *Neospora caninum* en rebaños lecheros: comparación de dos técnicas serológicas de ELISA

M. Pabón, F. López-Gatius, S. Almería

Presentado en el IX Congreso Ibérico de Parasitología. Coimbra (Portugal). 25-28 octubre 2005.

I. Introducción

Neospora caninum provoca abortos y mortinatos en ganado vacuno lechero (Anderson et al., 2000, Dubey, 2003), causando cuantiosas pérdidas económicas. Se han observado prevalencias que varían del 12.5% en Bélgica y Reino Unido, 20% en California (Dubey, 2003), 49% en Alemania, 63% en España o 76% en Holanda (Bartels et al., 2006).

Las técnicas histológicas, inmunohistoquímicas y de PCR así como el aislamiento del parásito son utilizadas en el diagnóstico post-mortem de la infección por *N. caninum*. Sin embargo, el diagnóstico de la infección en animales vivos se basa en la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* mediante técnicas serológicas como inmunoblotting, aglutinación, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y técnicas de ELISA (Inmuno ensayo de enzima ligada). Éstas dos últimas utilizadas muy frecuentemente (Greiner y Gardner, 2000; Jenkins et al., 2002). Estudios previos han comparado diferentes técnicas serológicas para la detección de anticuerpos de *N. caninum* (Álvarez-García et al., 2003; Reichel and Peiffer, 2002; Jenkins et al., 2000), pero los resultados de los diferentes trabajos son difícilmente comparables entre sí, no sólo por las variaciones en la técnica (preparación y concentración del antígeno, dilución del suero y conjugado utilizado...), sino también debido a las variaciones por edad, tales como las que se presentan entre fetos y hembras paridas (Álvarez-García et al., 2003) o fluctuaciones de los anticuerpos según el período de gestación (Stenlund et al., 1999; Quintanilla-Gonzalo et al., 2000; Pereira-Bueno et al., 2000). También se pueden presentar variaciones dependiendo de la finalidad en la aplicación de la técnica pues se han utilizado diferentes puntos de corte para diferenciar entre infección y aborto (Atkinson et al., 2000).

Sin embargo, un estudio reciente que comparó diferentes técnicas de ELISA, incluyendo las que comparamos en este estudio, tras la estandarización de resultados encontró una alta concordancia entre todas ellas, con altos niveles de sensibilidad y especificidad (von Blumröder et al., 2004). En el presente estudio y tras el análisis de un brote de abortos por *Neospora* en un rebaño de alta producción lechera de Cataluña (Capítulo I) (López-Gatius et al., 2004) se continuó con el estudio de varios rebaños de la misma zona para analizar las tasas de infección por *N. caninum* de los mismos comparando dos técnicas de ELISA comerciales: Herdcheck de laboratorios Idexx y Civtest de laboratorios Hipra. En aquellos animales en los que no coincidían los resultados de los dos ELISAs se realizó un análisis serológico mediante IFI para obtener el diagnóstico más acertado.

2. Materiales y métodos

2.1. Rebaños

Se recogió sangre de la vena caudal de 2435 animales pertenecientes a 5 rebaños de ganado vacuno de alta producción lechera de la zona de Lleida (noreste de España) (Tabla I). La recogida de muestras se realizó el mismo año en todos los rebaños y se

basó en un único muestreo de la totalidad de los animales en cada rebaño exceptuando los terneros menores de seis meses para evitar la presencia de anticuerpos calostrales.

Tabla I. Número de animales analizados según el rebaño de procedencia

Rebaño	1	2	3	4	5	TOTAL
n	394	259	1352	298	132	2435

n: número total de animales en cada rebaño

2.2. Técnicas serológicas:

2.2.1. ELISA Herdcheck de laboratorios Idexx y ELISA Civtest de laboratorios Hipra
 En nuestro estudio se utilizaron dos técnicas comerciales de ELISA que utilizan como antígeno extracto soluble de taquizoitos de *N. caninum*: Herdcheck de laboratorios Idexx S.A. (EEUU), (Paré et al., 1995) y Civtest de laboratorios Hipra S. A. (Girona-España), (Rebordosa et al., 2000) siguiendo las recomendaciones del fabricante y empleando los reactivos y los sueros testigos suministrados por las casas comerciales. En el caso de la técnica Civtest, el fabricante recomendaba seleccionar como positivos los valores superiores a 6 y como negativos los inferiores o iguales a 6.

Tabla II. Interpretación de los resultados de ELISA Herdcheck y ELISA Civtest

ELISA	Herdcheck S/P	Civtest IRPC
Negativo	< 0,5	≤ 6,0
Positivo	≥ 0,5	> 6,0

2.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).

En el caso de resultados discordantes entre los dos ELISAs, comparando Herdcheck y Civtest (>6) (26 animales de los 5 rebaños) se procedió a su análisis mediante técnica IFI según Ortuño et al., (2002) utilizando como nivel de corte 1:200. El análisis no se pudo realizar en 4 de las muestras por la falta de disponibilidad de suero.

2.3. Análisis estadístico.

El grado de concordancia entre las dos técnicas de ELISA y entre los dos ELISAs y la IFI se evaluó mediante el cálculo del valor Kappa (k) (Thrusfield M., 1995). El análisis del valor predictivo positivo y negativo de cada uno de los ELISAs en las muestras discordantes comparado con la IFI se realizó mediante el programa estadístico EpiSera.

3. RESULTADOS

3.1. Comparación de la seroprevalencia en rebaños mediante las dos técnicas de ELISA:

Los 5 rebaños de la zona estudiada presentaron importantes variaciones en los valores de prevalencia, con niveles desde 3,5% y 3,8% a 34,3% y 31,6% con las técnicas Herdcheck y Civtest respectivamente. Las prevalencias fueron bajas en algunos rebaños (rebaños 1 y 3) y elevadas en otros (rebaños 2 y 5).

En todos los rebaños los valores de prevalencia obtenidos por ambas técnicas fueron muy similares entre sí.

Tabla III. Prevalencia por granjas en cada prueba de ELISA.

REBAÑO	N TOTAL DE ANIMALES	Herdcheck	CIVTEST
		n / %	N / %
1	394	14 / 3,5	15 / 3,8
2	259	89 / 34,3	82 / 31,6
3	1352	65 / 4,8	62 / 4,6
4	298	53 / 17,8	48 / 16,1
5	132	40 / 30,3	38 / 28,8

La concordancia entre ambas pruebas fue muy elevada como lo indica el valor kappa medio de las explotaciones que fue de 0,94 con variaciones entre granjas de 0,82 a 0,96 al utilizar el punto de corte >6 en la técnica de Civtest (Tabla IV).

Tabla IV. Concordancia (valor K) entre Herdcheck y Civtest

REBAÑO	N		N	Valor K
	Herdcheck/CIVTEST + / +	Herdcheck/CIVTEST +/-		
1	12	2	3	0,821
2	81	8	1	0,921
3	61	4	1	0,959
4	48	5	0	0,940
5	38	2	0	0,964
TOTAL	240	21	5	0,943

N: número de animales.

La técnica de Idexx demostró una ligera mayor sensibilidad que la técnica de Civtest, pues del total de animales analizados por ambas técnicas en las 5 granjas, 21 animales considerados seropositivos en Herdcheck fueron seronegativos en Civtest (Tabla IV), mientras sólo 5 animales que fueron considerados seropositivos en la técnica de Civtest fueron seronegativos en Herdcheck.

3.2. Análisis de los resultados de sueros discordantes en los dos ELISAs mediante IFI

Al comparar los resultados de los 5 rebaños encontramos que sólo en un número muy reducido de animales (26 animales de 2435) no coincidían los resultados de los dos ELISAs. De ellos, 21 animales fueron positivos en Idexx y negativos en Civtest y 5 animales fueron negativos en Idexx y positivos en Civtest. (Tabla IV). No dispusimos de sueros para analizar las muestras por IFI en 4 animales (todos ellos positivos en Herdcheck y negativos en Civtest).

Al comparar los resultados de los dos ELISAs con la IFI en los 22 animales con sueros disponibles, se observó que de 17 animales seropositivos en Herdcheck, 9 resultaron positivos en IFI y 8 negativos. Por otro lado, de los 5 animales seropositivos en Civtest 3 resultaron positivos en IFI y los otros dos negativos (TABLA V).

(TABLA V) Comparación de los resultados de los dos ELISAs con IFI

	Herdcheck +/Civtest -	Herdcheck -/Civtest +	Total
--	-----------------------	-----------------------	-------

IFI +	9	3	12
IFI -	8	2	10
Total	17	5	22

La concordancia de la IFI con las muestras discordantes de ambos ELISAs fue muy baja (kappa de 0,053 y 0,047 para Herdcheck y Civtest respectivamente).

Cuando se analizó el valor predictivo de los positivos de cada uno de los tests ELISA comparado con la IFI, Herdcheck presentó un valor predictivo de los animales positivos de un 52,94% (30,8-73,99) y Civtest de un 60% (21,72-89,58). El valor predictivo de los negativos en referencia a la IFI fue del 40% (10,41-78,27) en Herdcheck y del 47,05 (26-69,2) en Civtest.

TABLA VI Resultados individuales de cada muestra discordante analizada mediante IFI

Granja	animal	Herdcheck	Indice Herdcheck	CIVTEST	Indice Civtest	IFI
5	2020	POS	3,5	NEG	0	NEG
5	2113	POS	2,7	NEG	-0,6	NEG
4	90	POS	0,8	NEG	-0,4	POS
4	109(2)	POS	1,1	NEG	0,8	POS
3	60	POS	0,6	NEG	5,0	POS
3	103	POS	1,0	NEG	1,3	NEG
3	184	NEG	0,4	POS	8,9	POS
3	303	POS	0,9	NEG	2,0	POS
3	368	POS	0,5	NEG	1,7	POS
2	29	POS	1,6	NEG	2,9	POS
2	39	POS	0,5	NEG	0,7	NEG
2	42	POS	1,1	NEG	2,9	NEG
2	83	POS	2,0	NEG	0,6	NEG
2	124	POS	1,3	NEG	4,3	NEG
2	223	NEG	0,1	POS	26,7	NEG
2	4581	POS	1,9	NEG	0,3	NEG
2	4651	POS	1,4	NEG	2,7	POS
1	3	POS	0,6	NEG	1,6	POS
1	28	NEG	0,1	POS	53,7	POS
1	423	NEG	0,1	POS	17,9	POS
1	428	NEG	0,1	POS	6,8	NEG
1	636	POS	0,5	NEG	3,8	POS

De los 17 animales Herdcheck +/Civtest -, 12 presentaron niveles de seropositividad menores a 1.5. Por otro lado, de los 5 animales Civtest+/Herdcheck-, dos presentaron niveles inferiores a 10 (TABLA VI)

Discusión

Una vez se ha confirmado la implicación de *Neospora* en los abortos es importante el análisis seroepidemiológico del rebaño completo para determinar la implicación de *Neospora* en los abortos y las posibles vías de infección de cara a plantear las medidas

de control apropiadas al rebaño (Hall et al., 2005). El estudio seroepidemiológico del rebaño posterior a un brote de abortos ayuda a confirmar la sospecha del aborto asociado a *Neospora* pues el diagnóstico individual sólo sugiere que el aborto podría estar relacionado con el parásito. Un diagnóstico más definitivo se puede lograr con el análisis de todo el rebaño (Jenkins et al., 2002) y se hace necesario para la aplicación de medidas idóneas de control en los rebaños (Dijkstra et al., 2003).

Sin embargo, uno de los principales problemas en el diagnóstico serológico ha sido la falta de concordancia entre las diferentes técnicas serológicas (Jenkins et al., 2000). Estudios previos que comparaban el ELISA Herdchek de laboratorios Idexx con la técnica de IFI e Inmunoblot (Williams et al., 1997; Schares et al., 1999) encontraron un buen nivel de concordancia de este test. En el presente estudio la comparación del ELISA Herdchek de laboratorios Idexx con el ELISA Civtest indicó una concordancia casi perfecta, de forma similar a los resultados del último estudio europeo que también comparó ambas técnicas entre otras (von Blumröder et al., 2004) aunque en su estudio el punto de corte utilizado fue >20 en el test Civtest, mucho más alto al que utilizamos en nuestro estudio (> 6). Nuestros resultados sugieren que ambos ELISAs pueden utilizarse indistintamente en el análisis de muestras de ganado vacuno lechero adulto. Únicamente se pudieron observar pequeñas discrepancias en algunas muestras. El análisis de las muestras discordantes en los ELISAs mediante IFI, no ayudó a descifrar cuál de los dos ELISA permitía una mejor verificación de las muestras discordantes que eran realmente positivas o no. La técnica IFI ha sido considerada como prueba referencia en varios estudios, sin embargo el hecho de que la IFI tampoco puede ser considerada como una técnica "Gold standard" ya ha sido indicado por otros autores (Frossling et al., 2003). En el caso de estos animales con resultados dudosos, un seguimiento de los mismos con muestreos posteriores a lo largo del tiempo ayudaría a reconocerlos como claramente seropositivos o seronegativos en los rebaños. Se seleccionó la técnica de Civtest para su uso en el futuro por la similitud de resultados con la técnica de Herdchek, y por la imposibilidad de utilizar este kit por problemas de comercialización en España y su venta discontinuada por un tiempo. Además observamos mayor estabilidad en el tiempo del control positivo.

La ausencia de un punto de corte perfecto (máxima sensibilidad (Se) y especificidad (Sp)) y las diferentes aplicaciones prácticas de la técnica hace que se ajusten los puntos de corte dependiendo del propósito de la investigación (Reichel y Pfeiffer, 2002) con la aplicación de un punto de corte para máxima Se para detectar la seroprevalencia de los animales antes de su entrada al rebaño y el punto de corte de máxima Sp para determinar la presencia de la infección por *N. caninum* en un área determinada en estudios epidemiológicos en uno o varios rebaños. Otra posibilidad es emplear el punto de corte obtenido para máxima o igual sensibilidad y especificidad, asumiendo los posibles falsos positivos y negativos y confirmar los casos dudosos mediante western blot (Álvarez-García et al., 2003) o mediante muestreos seriados de los mismos. Aunque un punto de corte seleccionado para máxima sensibilidad no sería apropiado en un brote de abortos para detectar adecuadamente la asociación entre seropositividad y aborto (Schaes et al., 1999). En nuestro estudio al aplicar los puntos de corte recomendados por las casas comerciales encontramos la mayor concordancia con el Civtest (>6) sin pérdida de sensibilidad e incluso concordancias igualmente elevadas utilizando diferentes puntos de corte en el Civtest.

Las tasas de prevalencia encontradas en el estudio fueron variables en la zona en función de la granja analizada, éste hecho pudo ser debido a las tasas de transmisión vertical a lo largo del tiempo en cada rebaño, por reposición de animales procedentes de madres seropositivas en mayor o menor grado en cada rebaño en el momento del

estudio. De hecho, en las dos explotaciones con prevalencias más bajas no habían entrado animales procedentes de otras explotaciones durante los últimos dos años. Todos los rebaños analizados presentaron animales con anticuerpos frente *N. caninum* evidenciando la elevada presencia de *N. caninum* en la zona por lo que es importante llegar a un adecuado diagnóstico para el que ambas técnicas Herdchek y Civtest pueden utilizarse indistintamente. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la neosporosis en Cataluña y que su relación con los cuadros de aborto debe ser tenida en cuenta en los protocolos de diagnóstico.

Referencias:

- Álvarez-García G., Fernández-Collantes E., Costas E., Reburdosa X., Ortega-Mora L. M. 2003. Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Vet. Res.* 34 : 341-352.
- Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci* 60:61,417-431.
- Atkinson R A, Cook R W, Reddaehi EA, Rothwell J, Broady KW, Harper P, Ellis JT. 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Aust Vet J.* 78 :262-266
- Bartels CJ, Amáiz-Seco B, Ruiz-Santa-Quiteria A, Björkman C, Frossling J, von Blumroder D, Conraths FJ, Schares G, van Maanen C, Wouda W, Ortega-Mora LM. 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet Parasitol.* 137, 17-27.
- Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W. 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.* 110 161-169.
- Dubey JP. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol* 2003; 89 542- 556.
- Frossling J, Bennett B, Lindeberg A, Björkman C. 2003. Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. *Prev vet Med* 20;57.3.141-53.
- Greiner M and Gardner IA. 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic test. *Preventive veterinary Medicine* 45;3-22.
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. 2005. Neospora abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol.* 128(3-4):231-41.
- Jenkins MC, Cover JA, Björkman C, Anderson TC, Romand S, Vinyard B, Uggla A, Thullier P, Dubey JP. 2000. Serological investigation of an outbreak of Neospora caninum-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. *Vet Parasitol.* 94.1-2.17-26.
- Jenkins M, Baszler T, Björkman C, Schares G, Williams D. 2002. Diagnosis and seroepidemiology of Neospora caninum-associated bovine abortion. *Int J Parasitol.* May;32(5):631-6.
- López-Gatius F, López-Béjar M, Murugavel K, Pabón M, Ferrer D, Almería S. 2004. Neospora-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in North-east Spain. *J Vet MedB* 51,348-352.
- Ortega-Mora LM y Aduriz G. 2005. Nuevas perspectivas en el diagnóstico laboratorial de las protozoosis tisulares reproductivas en los rumiantes domésticos. X Simposio Anual AVEDIJA.
- Ortuño A, Castilla J, Almería S. 2002. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs from Spain. *J Parasitol.* 88(6):1263-6.
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. 1995. An enzyme-linked immunosorbent (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* spp. infection in cattle. *J. Vet. Diag. Invest.* 7: 352-359.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega-Mora L.M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle; pattern of transmission and age-related antibody fluctuations, in: Hemphill A., Göttstein B.(eds.). A european perspective on *Neospora caninum* . *Int. J. Parasitol.* 30, 906-909.
- Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega-Mora L.M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle; relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int. J. Parasitol.* 30 901-906.

Rebordosa X, Álvarez-García G, Collantes E, Ortega LM, Artigas C. 2000. Desarrollo de un ELISA indirecto para la valoración de anticuerpos contra *Neospora caninum*. Laboratorio Veterinario, Avejilla 17, 5-8.

Reichel MP, Pfeiffer DU. 2002. An analysis of the performance characteristics of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol.* Aug 21;107.3:197-207.

Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Björkman C. 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* Sep 1;85.4:227-34

Schares G, Conraths FJ, Reichel MP. 1999. Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy her in New Zealand. *Int. J. Parasitol.* 29:1659-1667

Thrusfield M. 1995. Diagnostic testing , p. 266-285. In M. thrusfield (ed.), *Veterinary epidemiology*, second edition. Blackwell Science Ltd., Oxford.

von Blumröder D, Schares G, Norton R, Williams D J L., Esteban-Redondo I, Wright S, Björkman C, Frösling J, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Ortega-Mora L. M, Sager H, Hemphill A, Muanen Van C, Wouda W, Conraths F. J. 2004. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Veterinary Parasitology* 120: 11-22.

Williams DJL., McClarry J, Guy F, Barber J, Trees AJ. 1997. A novel ELISA for detection of *Neospora*-specific antibodies in cattle. *Vet Record.* 140 328-331. **Diagnóstico serológico de la infección por *Neospora caninum* en rebaños lecheros: comparación de dos técnicas serológicas de ELISA**

CAPÍTULO IV. Dinámica de la respuesta inmune humoral frente *N. caninum* durante la gestación en ganado vacuno lechero.

M. Pabón, F. López-Gatius, S. Almería

Presentado en el IX Congreso Ibérico de Parasitología. Coimbra (Portugal). 25-28 octubre 2005.

1. Introducción

Neospora caninum es reconocido en la actualidad como uno de los principales patógenos causantes de aborto en ganado bovino con claros efectos adversos en las explotaciones (Anderson et al., 2000; Quinn et al., 2002; Dubey, 2003).

La patogénesis del aborto inducido por *N. caninum* es todavía desconocida en muchos aspectos. Al contrario que *Toxoplasma gondii*, con el que está estrechamente relacionado en lo que se refiere a la estructura, genética y inmunología del parásito (Dubey, 2003b), los anticuerpos frente *N. caninum* no son protectores y el parásito se puede transmitir de la madre a la progenie durante sucesivas gestaciones (Björkman et al., 1996) y causar abortos repetitivos.

Neospora caninum puede ser transmitido a través de la placenta a variadas especies hospedadoras. Aunque hay poco conocimiento respecto al modo natural de diseminación y distribución de *N. caninum* en tejidos de los hospedadores, estudios previos han demostrado que la transmisión vertical es la principal vía de transmisión del parásito en ganado vacuno (Schares et al., 1998; Quinn et al., 2002) con niveles que pueden alcanzar hasta el 95% (revisado Dubey, 2003a).

En lo referente a la respuesta inmunitaria del hospedador, la presencia de anticuerpos frente a *N. caninum* es indicativa de contacto con el parásito, ya que la infección por el mismo provoca el desarrollo de una respuesta humoral específica. El diagnóstico de la infección por *N. caninum* está basado en diversas técnicas serológicas entre otras NAT (test de aglutinación para *Neospora*), IFI (Inmunofluorescencia indirecta) o ELISAs (diversos tipos) que son usualmente utilizadas para la detección de anticuerpos frente al parásito (Schares et al., 1998; Björkman et al., 1999; Dubey, 2003b).

Estudios previos han demostrado que los niveles de anticuerpos frente *N. caninum* están directamente relacionados con el grado de exposición al parásito (Quintanilla-Gonzalo et al., 2000). De acuerdo con diversos estudios serológicos las vacas gestantes seropositivas presentan cuadros de abortos más frecuentes que los animales seronegativos. En general, se han observado que paralelamente a la subida de anticuerpos frente al parásito, los abortos se producen a partir de los 3 meses de gestación – mayoritariamente entre el segundo y el último tercio (Stenlund et al., 1999; Dubey, 2003a). Por otro lado, en vacas infectadas crónicamente el aborto ocurre sobre todo en el segundo tercio de la gestación (López-Gatius, et al., 2004a, b).

Las infecciones experimentales indican que el aborto está directamente relacionado con el periodo de gestación en el que hembra adquirió la infección por *N. caninum*, indicando que el sistema inmune fetal es determinante en la manifestación de la infección (Fioretti, et al., 2003), y la edad gestacional puede determinar la

manifestación de la infección tanto en infecciones experimentales como en infección natural (Dubey, 2003a).

De acuerdo con los conocimientos actuales los animales seropositivos a *N. caninum* permanecen como portadores toda la vida. También se asume que todos los animales infectados continúan produciendo anticuerpos específicos. Sin embargo, se han observado fluctuaciones en los anticuerpos en vacuno infectados natural y experimentalmente (Jenkins et al., 1997; Dubey et al., 1997; Quintanilla-Gozalo et al., 2000). No se conoce todavía si estas fluctuaciones son debidas a estímulos antigénicos por reactivación de infecciones latentes o por reinfecciones a partir de una fuente externa. En concreto, durante la gestación la interacción entre el sistema inmune y el parásito parece dar lugar a picos de subida y bajada de anticuerpos. En ocasiones estos niveles incluso se encuentran por debajo de los niveles de umbral de positividad en las técnicas serológicas habituales (Stenlund et al., 1999; Guy et al., 2001; Sager et al., 2001; Maley et al., 2001; Trees et al., 2002).

En el presente estudio se analizó la evolución de la respuesta inmunitaria humoral y su relación con la presencia de abortos en un rebaño de ganado vacuno lechero infectado crónicamente por *N. caninum* y que presentó problemas de abortos en los tres años anteriores al estudio.

2. Material y métodos

2.1. Animales y manejo

En el presente estudio se incluyeron 23 vacas Holstein-Friesian de una explotación lechera de Lleida, en las cuales se habían realizado estudios serológicos anuales en al menos dos años anteriores (2001-2003) y durante el año de estudio (2004). De estos animales, 16 eran animales seropositivos en los análisis serológicos de años anteriores a 2004 y el resto (n=7) eran seronegativos.

El rebaño había presentado problemas de abortos endémicos por *N. caninum* en los años anteriores a 2004, con prevalencias de anticuerpos en el rebaño del 21% en 2001, del 6.0% en 2002 y del 13.3% en 2003.

De acuerdo con los análisis, todos los animales seropositivos habían presentado abortos en algún momento en los años anteriores a 2004. En el momento del estudio las vacas tenían entre 2 y 10 años de edad (5,4 años de promedio). Los animales estaban libres de tuberculosis y brucelosis y fueron negativos a BVDV (Virus de la Diarrea Viral Bovina).

Todas las vacas fueron inseminadas artificialmente con toros de raza Frisona (n=14) o Limousin (n=9) y el diagnóstico de gestación se hizo mediante ultrasonido transrectal a los 34 y 60 días post-inseminación y por palpación rectal a los 90 y 120 días. Hasta los 180 días de gestación se observaron las vacas diariamente para detectar signos de aborto. Finalmente, a los 180 y 210 días se realizó palpación rectal.

2.2. Recolección de muestras y análisis serológico

Del total de los animales estudiados se tomaron muestras de sangre antes de la inseminación artificial (IA) y a los 45, 90, 120, 150, 180 y 210 días de gestación. También se les tomaron muestras de sangre en el momento del parto o antes del mismo en caso de aborto. La sangre se recogió de la vena coccígea. Las muestras de sangre se centrifugaron y el suero obtenido fue almacenado a -20° C hasta su posterior análisis. En uno de los animales seropositivos se recogieron muestras en dos gestaciones consecutivas.

Los sueros fueron analizados para la detección de anticuerpos frente a *N. caninum* usando el kit comercial ELISA (Civtest de laboratorios Hipra) basado en el lisado completo del taquizoito de NC-1.

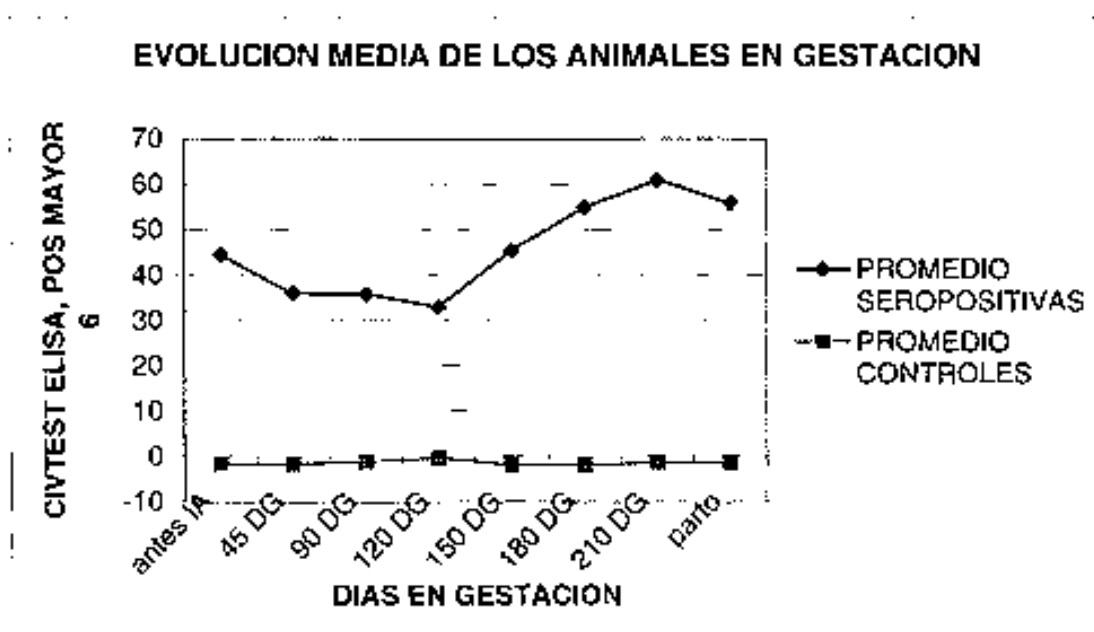
2.3. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante el programa estadístico SPSS. Se analizó la influencia de las siguientes variables: toro en la inseminación (Frison o Limousin), aborto previo (presencia o ausencia), aborto en el año de estudio (presencia o ausencia) y días de gestación en el momento del aborto.

Resultados

Todos los animales seronegativos (n=7) permanecieron como tales a lo largo de todo el estudio (Figura 1). En general, las vacas seropositivas mostraron una dinámica de anticuerpos muy similar entre sí, siguiendo un patrón bastante uniforme caracterizado por un aumento del valor promedio muy por encima de la media (mayor de 10) desde antes de la IA, con un aumento del nivel de anticuerpos hacia el segundo tercio de gestación, alcanzando un máximo a los 150-210 días de gestación y posterior descenso antes del parto (Figura 1).

Figura 1. Dinámica de la evolución media de los animales seropositivos y seronegativos a *N. caninum* a lo largo de la gestación



Como excepción, el animal 22 considerado seropositivo en años anteriores a 2004, mantuvo niveles de anticuerpos frente a *N. caninum* por debajo del umbral de seropositividad durante toda la gestación en el año de estudio (2004) y por ello fue considerado seronegativo, sin embargo, presentó un aborto hacia el día 150 de gestación.

El resto de las vacas que en años anteriores a 2004 eran seropositivas permanecieron como tales durante todo el año de estudio, a excepción de un muestreo de la vaca 124 que fue seronegativa en el primer muestreo antes de la IA pero presentó seroconversión en todos los muestreos posteriores. Este animal fue analizado en la gestación siguiente.

Los máximos niveles en los títulos de anticuerpos fueron observados en los muestreos correspondientes a los 150 días de gestación (4 animales), 180 días de gestación (4 animales) o 210 días de gestación (2 animales) (Tabla 1). En algunos animales los niveles más elevados se observaron al parto (3 animales), aunque estos habían presentado previamente niveles similares a los 210 días. En 4 animales el nivel máximo de anticuerpos tuvo lugar al inicio del experimento, antes de la IA, sin embargo, 2 de ellos (números 42 y 29) presentaron siempre niveles de anticuerpos muy bajos durante todo el periodo de estudio (2004) (Tabla 1).

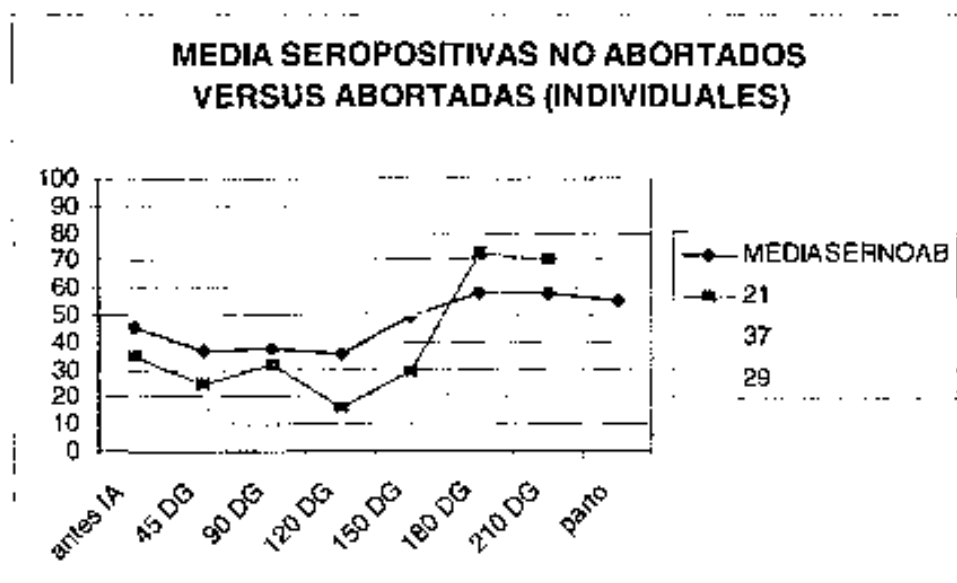
Tabla 1: Títulos de anticuerpos de los animales seropositivos frente a *Neospora caninum* a lo largo del periodo gestacional durante el año de estudio (2004)

Animal	Antes IA	45 DG	90 DG	120 DG	150 DG	180 DG	210 DG	Parto
23	22,84	31,81	30,01	30,01	81,13	91,90	84,72	60,24
124	-1,82	26,16	32,88	24,63	21,67	27,50	46,60	51,00
192	59,61	32,52	40,69	42,30	34,50	40,24	46,25	51,18
42	10,54	7,36	6,54	5	5,82	7,73	6,73	8,54
185	30,73	26,36	27,63	29,27	78,54	68,9	66,73	65,63
25	76,6	42	31,36	37,36	82,54	73,9	66,73	56,54
144	68,73	72,9	67,9	71,36	82,75	63,9	69,54	76,73
38	53,73	46,27	46,27	49	58,64	68	63,82	63,27
80	80,54	49,09	55,9	68,72	84,45	73,18	69,36	75,81
700	66,02	46,23	57,33	29,21	28	89,68	93,78	81,35
637	74,23	37,66	37,54	32,83	31,62	51,42	53,34	62,03
128	13,03	15,57	16,89	10,5	18,22	63,25	46,83	18,47
124b	36,33	44,05	37,89	29,33	30,29	34,27	38,86	44,17
21	34,95	24,81	32,17	16,02	28,85	72,26	70,37	Aborto
37	66,07	58,08	43,02	40,78	51,81	45,17	89,83	67,14 M
29	17,64	13,82	7,18	9,73	8,73	8,81	Aborto	-

Durante el año de estudio 2 animales seropositivos presentaron abortos (a los 180 y 210 días de gestación) y 1 animal tuvo un mortinato. De los 3 animales seropositivos que abortaron a lo largo de la gestación en estudio, exceptuando el animal 29 (siempre presentó valores bajos aunque por encima del valor del umbral de seropositividad) (Figura 2), los otros 2 mostraron los máximos niveles de anticuerpos alrededor de la fecha de aborto, con niveles superiores a la media de anticuerpos de los animales no abortados durante el año de estudio. Sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, probablemente debido al escaso número de animales analizados (Figura 2).

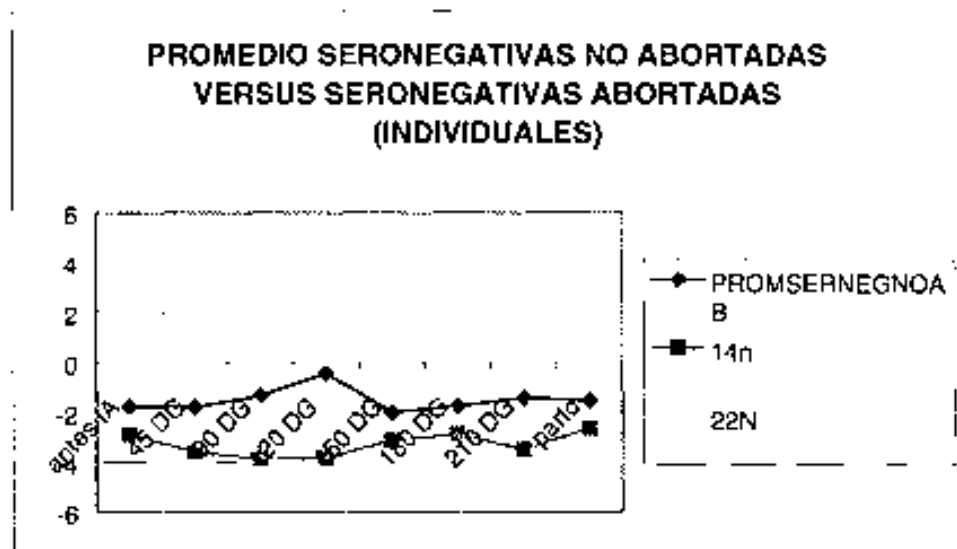
Tras un análisis meticuloso del animal 22, previamente seropositivo y posteriormente seronegativo tras haber tenido un aborto en el año de estudio, se observó que en los 3 años previos al estudio (2001 – 2003) los niveles de seropositividad de éste animal habían sido muy bajos, ligeramente por encima de 6 y nunca superando el nivel de 10. A pesar de que los niveles nunca superaron el umbral de seropositividad, la dinámica de anticuerpos a lo largo de la gestación fue similar a la de los animales seropositivos, con un aumento de los niveles alrededor del periodo de aborto (Figura 3).

Figura 2. Comparación de la dinámica de anticuerpos en los animales seropositivos que no abortaron (media) y los animales seropositivos que abortaron (individuales) en el año de estudio (2004).



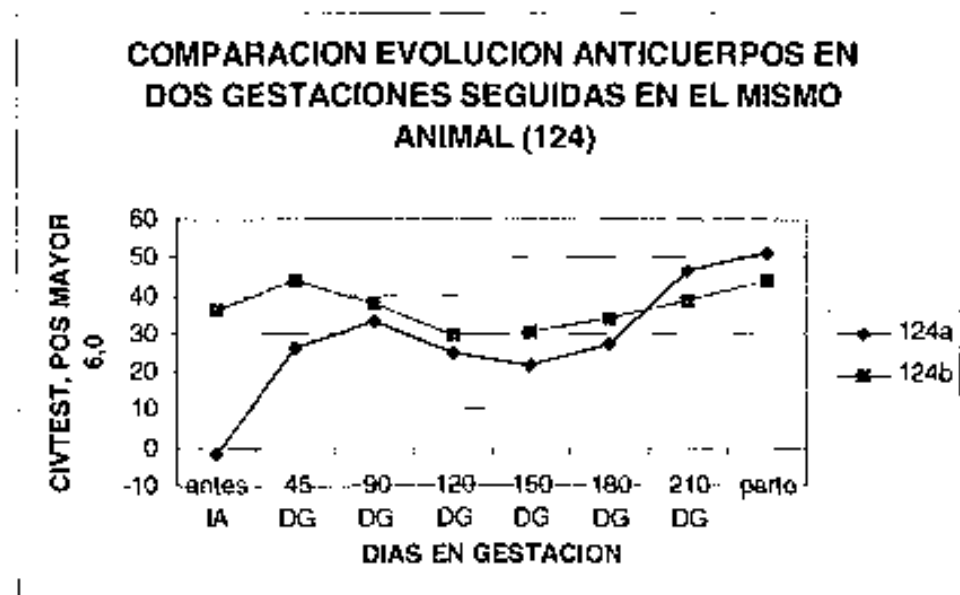
Un análisis más detenidamente del animal número 22, previamente seropositivo antes del estudio pero seronegativo abortado en el año del estudio, indicó que en los 3 años previos los niveles de seropositividad habían sido muy bajos, ligeramente por encima de 6. Sin embargo la dinámica de anticuerpos a lo largo de la gestación fue similar a la de los animales seropositivos, con aumentos de los niveles de anticuerpos alrededor del periodo del aborto (Figura 3).

Figura 3. Comparación de la dinámica de anticuerpos en animales seronegativos que no abortaron (media) y los animales seronegativos que abortaron (individuales) en el año de estudio (2004).



Asimismo, en 1 animal la evolución de los anticuerpos frente a *N. caninum* en dos gestaciones consecutivas mostró una dinámica muy similar en ambos años (2003-2004), con pequeñas variaciones en los niveles de seropositividad en el segundo año (2004) (Figura 4).

Figura 4. Evolución de anticuerpos frente a *Neospora caninum* a lo largo de dos gestaciones consecutivas en el animal 124.



No se observaron diferencias significativas entre el efecto toro en la inseminación artificial (IA) y el aborto, posiblemente debido al bajo número de muestras analizadas. De las hembras inseminadas artificialmente con Frison abortó una y hubo dos

mortinatos y de las inseminadas artificialmente con Limousin abortaron dos y no hubo mortinatos.

Discusión

En el presente estudio, se observó que la mayoría de los animales (14 de 16) previamente seropositivos (2001-2003) mantuvieron niveles por encima del umbral de seropositividad durante toda la gestación en el año de estudio (2004). En concordancia con el presente estudio, Jenkins et al (1997) observaron niveles elevados de anticuerpos frente a *N. caninum* que se mantuvieron elevados durante 8-15 meses en 10 vacas naturalmente infectadas. Similarmente, Stenlund et al. (1999) observaron niveles elevados de anticuerpos frente a *N. caninum* en dos gestaciones consecutivas de 18 vacas naturalmente infectadas pero en su caso se observaron fluctuaciones evidentes en los niveles de anticuerpos con diferencias significativamente elevadas en el segundo tercio de gestación tanto en las hembras que abortaron como en las que no abortaron. En concordancia con lo observado por Quintanilla-Gozalo et al. (2000) en hembras que abortaron.

Se observó que un animal previamente seropositivo frente a *N. caninum* (2001-2003) presentó seronegatividad frente al parásito en todos los muestreos realizados en el año de nuestro estudio. Sin embargo, este animal había presentado previamente niveles de seropositividad muy bajos, ligeramente por encima de 6 y nunca superando el nivel de 10. Otro animal al primer muestreo (antes de la IA), no superó el título del umbral de seropositividad, pero sí en todos los demás muestreos realizados posteriormente (incluyendo dos gestaciones).

En general, se observó que los niveles de anticuerpos frente a *N. caninum* desarrollados por los animales gestantes siguieron una dinámica caracterizada por un aumento del nivel de anticuerpos hacia el segundo tercio de la gestación, alcanzando un título máximo a los 150-210 días de gestación y posteriormente un leve descenso de los títulos antes del parto. Se observó que este modelo fue seguido tanto por los animales seropositivos que abortaron (n=2) y por el que presentó un mortinato, como por los seropositivos que no lo hicieron (n=13). Nuestros resultados son similares con los de Stenlund et al., (1999) que describieron un patrón similar de nivel de anticuerpos frente a *N. caninum* tanto en los animales que abortaron como en los que no lo hicieron.

Incluso en un animal seronegativo que abortó (el animal previamente seropositivo comentado con anterioridad y que los niveles de anticuerpos nunca superaron el umbral de seropositividad), la dinámica de anticuerpos a lo largo de la gestación fue similar a la de los animales seropositivos, con un aumento de los niveles alrededor del periodo de aborto.

También se observaron algunas excepciones al modelo general. Un animal seropositivo que abortó no presentó el pico de anticuerpos previo al aborto observado en el resto de los animales y otro animal seropositivo presentó títulos bajos durante toda la gestación.

Estudios previos realizados en vacas gestantes seropositivas, han descrito fluctuaciones en los títulos de anticuerpos en animales seropositivos, y estas fluctuaciones fueron estadísticamente significativas (Stenlund et al., 1999), alcanzándose niveles máximos de anticuerpos a los 4-5 meses antes del parto (5-6 meses de gestación) y posterior descenso de los mismos. (Dannat et al.,1995)) observó picos de anticuerpos en animales a los 6-7.5 meses de gestación y con posterior descenso, aunque con fuertes fluctuaciones. Por su parte, Conrad et al. (1993) observaron aumentos de niveles de anticuerpos que se mantuvieron elevados hasta el parto mientras que en el estudio de

Pereira-Bueno et al., (2000) los títulos de anticuerpos se elevaron hacia el último tercio de la gestación a partir del sexto mes dando lugar a terneros congénitamente infectados.

En nuestro estudio se observaron picos en los anticuerpos a los 5 (4 animales), 6 (4 animales) y a los 7 meses de gestación (2 animales). Tres animales presentaron niveles máximos en torno al parto pero la dinámica general de todos los animales analizados fue de descenso en ese momento.

Del total de 16 animales seropositivos hubo 2 abortos y 1 mortinato y estos resultados están dentro de los niveles de aborto observados con anterioridad en el rebaño. Diversos estudios han demostrado que vacas seropositivas son más susceptibles de abortar que las seronegativas (Thurmond y Hictala, 1997; Lopez-Gatius et al., 2004a, 2004b), como fue el caso en el que los animales seropositivos en años anteriores (2001-2003) habían abortado de manera significativamente más elevada que los seronegativos (Capítulos I y II).

Según estudios previos, los animales que abortan presentan niveles de anticuerpos mayores que los que no abortan (Paré et al., 1997; Quintanilla- Gonzalo et al., 2000) indicando una estrecha relación entre los altos niveles de anticuerpos y el aborto (Dubey, 2003a, b) sobre todo en la segunda mitad de la gestación (Guy et al., 2001; Lopez-Gatius et al., 2004b) (Capítulo II).

En el presente estudio, uno de los animales seropositivos que abortaron (n=2) y el que tuvo un mortinato presentaron niveles máximos de anticuerpos superiores a la media del resto de los animales seropositivos. Nuestros resultados están de acuerdo con los presentados por Guy et al. (2001) que observaron un pico de anticuerpos en animales infectados por *N. caninum* antes del aborto. Se podría inferir que estos resultados fueron posiblemente consecuencia de reactivación de infección y paso de taquizoítos a los fetos, causando el aborto. Desafortunadamente, no se pudo analizar si los fetos de las vacas analizadas estaban también infectados por no tener acceso a los mismos, pero debido a la elevada eficiencia en la transmisión vertical de *Neospora* al ganado bovino (Anderson et al., 1997; Davison et al., 1999, López-Gatius et al., 2004a) ésta sería una posible explicación.

Niveles elevados de anticuerpos a los 8 meses de gestación, conjuntamente con un aumento del nivel de anticuerpos desde los 3 meses de gestación puede ser indicativo de elevado riesgo de transmisión de la infección a los fetos (Paré et al., 1997). Pereira-Bueno et al., (1999) observaron que una subida en los niveles de anticuerpos en el último tercio de gestación está ligada al nacimiento de terneros congénitamente infectados. En nuestro estudio los 2 animales seropositivos que abortaron tuvieron lugar en tercer trimestre de gestación, uno de los que abortó presentó el nivel máximo de anticuerpos a los 180 días de gestación y uno de los mortinatos presentó el pico de anticuerpos a los 210 días de gestación y otras 6 hembras gestantes seropositivas también presentaron el nivel máximo de anticuerpos hacia el final de la gestación por lo que es muy posible que su descendencia estuviera también infectada.

Se observó que una vaca seropositiva que abortó no presentó ni fluctuaciones ni pico en los anticuerpos. Posiblemente la debilidad del sistema inmune de este animal interfirió en la respuesta inmunitaria frente al parásito.

El hecho de que el aborto en una vaca seronegativa previamente seropositiva siguiera el modelo general de los animales seropositivos podría indicar infección por *Neospora* en este animal, mientras una vaca seronegativa sin ningún tipo de fluctuaciones en los

anticuerpos tuviera un mortinato podría haber sido debido a factores variados como manejo, genético, inmunitario, otros patógenos, etc.

Se observó que no todos los animales seropositivos abortaron. Hay que tener en cuenta que *N. caninum* es un parásito muy bien adaptado al ganado vacuno y que sólo una pequeña proporción de las vacas abortan (Jenkins et al., 2002). Aunque los fetos pueden morir en útero, ser reabsorbido, momificados y/o autolizados, o mortinatos sólo ocurre en un pequeño porcentaje de los animales seropositivos (Fioretti et al., 2003). La infección por *N. caninum* es un factor determinante en la presentación del aborto pero no es suficiente, con lo cual adquieren gran importancia la existencia de factores endógenos y exógenos que intervienen en la manifestación de la infección en forma de abortos y/o mortinatos (Quintanilla-Gozalet al., 2000). En general, se considera multicausal el aborto provocado en la infección por *Neospora*. Se observa que factores como niveles de anticuerpos de la madre durante la gestación (Paré et al., 1997), infecciones virales como el BVD (Björkman et al., 1999) y hereditario (Björkman et al., 1996) parecen contribuir al riesgo de aborto en animales infectados por *Neospora*.

El hecho de que las gestaciones analizadas no fueron coordinadas en el tiempo (tuvieron lugar a lo largo del año en concordancia con el estudio de Stenlund et al (1999) y la observación de una dinámica similar en dos gestaciones sucesivas, sugiere que el aumento en los anticuerpos no fue debido a una reinfección, sino a una reactivación del parásito en las vacas crónicamente infectadas. Los títulos de anticuerpos elevados a los 5 a 6 meses (en 9 animales) antes del parto, sugiere que sea este el momento de la reactivación de una infección latente que tendrá como consecuencia el aborto o el nacimiento de descendencia infectada dependiendo del período en el cual ocurra la reactivación. Los factores causantes de esta reactivación aún están en estudio (Pereira-Bueno et al., 1999), aunque se podría inferir que un cuadro de inmunosupresión inducida por la gestación podría dar lugar a la reactivación del tejido quístico latente causando de este modo una parasitemia. Sin embargo, este mecanismo todavía no se ha podido demostrar en el curso de la neosporosis (Dubey, 2003a).

En conclusión, se han observado que los títulos de anticuerpos frente a *N. caninum* en los animales seropositivos permanecieron elevados por encima del umbral de seropositividad en la mayoría de los animales durante la gestación. En general, la dinámica de anticuerpos fue muy homogénea tanto en animales que abortaron como en los que no abortaron, y supuso un aumento de los niveles a partir del segundo trimestre de gestación. lo que sugiere una reactivación de la infección en este período. Los animales que abortaron presentaron en general niveles de anticuerpos máximos superiores a la media del resto de los animales seropositivos antes de que ocurriera el aborto. La observación de un pico de anticuerpos en animales infectados por *N. caninum* antes de ocurrir el aborto podría sugerir una reactivación de la infección y paso de taquizoitos a los fetos pues entre los bovinos no hay transferencia de anticuerpos de la madre al feto durante la gestación.

Referencias bibliográficas

- Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. Infection in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 210:169-72
- Anderson ML, Audriano-Arriaga AG, Conrad PA. 2000. Neosporosis in cattle. Anim Reprod Sci 60:61,417-431.

Björkman C, Johansson O, Stenlund S, Holmdahl OJM, Uggla A. 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208, 1441-1444.

Björkman C, Näslund K, Stenlund S, Maley S W, Buxton D, Uggla A. 1999. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. J. Vet. Diagn. Invest. 11, 41-44.

Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Arlans A, Dubey JP, Dubamel G, Barr B. 1993. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 572-578.

Dannatt L, Guy F, Trees AJ. 1995. Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd. Vet Rec Nov 25;137.22.566-7

Davison H C, Otter A, Trees AJ. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. Int. J. Parasitol. 29:1683-9

Dubey JP, Jenkins MC, Adams DS, McAllister MM, Anderson-Sprocher R, Baszler TV, Kwok OCH, Lally NC, Björkman C, Uggla A. 1997. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. J. Parasitol. 83, 1063-1069.

Dubey JP. 2003 a. Neosporosis in cattle. J. Parasitol. 89, S42- S56.

Dubey JP. 2003 b. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. The Korean J. Parasitol. 41, 1-16.

Fioretti D, Pasquali P, Diaferia M, Mangili V, Rosignoli L. 2003. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. J Vet Med [B. 50, 399-404.

Guy CS, Williams DJL, Kelly DE, McGarry FW, Guy F, Björkman C, Smith RF, Trees AJ. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. Vet Rec. 149, 443-449.

Jenkins M C, Baszler T, Björkman C, Scharcs G, Williams D. 2002. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. Int. J. Parasitol. 32, 631-636.

Jenkins MC, Wouda W, Dubey JP. 1997. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4, 270-274.

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

López-Gatius F, Pabón M, Almería S. 2004b. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. Theriogenology 62, 606-613

Maley SW, Buxton D, Thomson KM, Schriefer CE, Jones EA. 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. Vet. Parasitol. 96, 1-9.

Pare J, Thurmond MC, Hietala SK. 1997. *Neospora caninum* in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. J. Parasitol. 83, 82-87.

Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega-Mora L M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations in. Hemphill A, Gottstein B. A European perspective on *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 30: 906-909.

Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. 2002. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy. Trends of Parasitol. 18, 391-394.

Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega-Mora LM. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. Int. J. Parasitol. 30, 901-906.

Sager H, Fijster I, Furrer K, Strasser M, Waldvogel A, Buerlin P, Audige E, Gottstein B. 2001. A Swiss case-control study histopathology and serology. Vet. Parasitol. 102, 1-15.

Scharcs G, Peters M, Wern R, Bärwald A, Conraths FJ. 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. Vet. Parasitol. 80, 87-98.

Stenlund S, Kindahl H, Magnusson Um, Uggla, A, Björkman C. 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 85, 227-234.

Thurmond MC, Hietala SK. 1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58, 1381-1385.

Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RE, Williams DJ. 2002. *Neospora caninum* oocyst challenge of pregnant cows. *Vet Parasitol.* 109, 147-154.

CAPÍTULO V. Chronic infection of *Neospora caninum* and repeated abortion in dairy cows: a 3-year study.

M. Pabón^a, F. Lopez-Gatius^b, I. Garcia-Ispuerto^a, G. Bech-Sabat^b, S. Almeria^{a,c*}.

^aDepartment of Anatomy and Animal Health, and ^cResearch Centre in Animal Health (CReSA): Autonomous University of Barcelona, Bellaterra, Spain.

^bDepartment of Animal Production, University of Lleida, E.T.S.E.A., Rovira Roure 177, 25198 Lleida, Spain.

*Corresponding author. Tel.: +34-93-581-2847; fax: +34-93-581-2006. E-mail address: Sonia.Almeria@uab.es

Sometido para publicación en Veterinary Parasitology

Abstract

The serological status of *Neospora* was monitored in animals older than 6 months in a dairy herd with a 3-year history of prevalent *N. caninum* and *N. caninum*-associated abortions. The numbers of animals in the herd tested each year of the study period were 259, 222 and 231, respectively. A separate analysis was performed on the 122 animals persisting in the herd for the three years. The overall seroprevalence of *N. caninum* in the herd decreased from 31.7% in the first year to 24.8% in the second year and to 19.9% in the third year of the study, while the overall abortion rate decreased from 20.6% in the first year to 5.5% in the second year, and 9.9% in the third. These decreases occurred in response to control measures adopted from the second year onwards, such as culling *Neospora*-seropositive aborted animals and inseminating *Neospora*-seropositive dams with beef bull semen. Of the total number of abortions recorded in seropositive animals, 51% were repeat abortions that occurred in 36.8% of the animals in the herd with a previous history of abortion. The initial seroprevalence of *Neospora* in the 122 animals followed for the 3 years was 18%, increasing to 21.3% in the second and third years. Serconversion only occurred in 4 animals during the second and third years of the study. In the 122 animals, abortion occurred only in seropositive animals and 61.5% of the total number of abortions in seropositive animals were repeat abortions occurring in 26.7% of the total number of animals with a previous history of abortion. These results indicate that *Neospora* seropositivity can be very stable through time and *N. caninum* infected cows can show a high rate of repeat abortions. The present data reinforce the idea that annual serological screening for *Neospora* can be an effective and rapid method of detecting *N. caninum* infection, such that control measures can be established at the farm level.

Key words: *Neospora caninum*, chronic infection, repeat abortion, dairy cattle

Introduction

Neospora caninum is an intracellular protozoan that infects domestic and wild canids, ruminants and other blooded animal species (Dubey, 2003). The pathogenesis of neosporosis in cows is complex (Dubey et al., 2006) and it is not well understood why some animals abort and others do not.

Despite dogs and coyotes being the true hosts of *N. caninum* (McAllister et al., 1998; Gondim et al., 2004), the most common mode of infection and maintenance of infection in cattle herds is vertical or endogenous transplacental transmission from naturally infected dams to the fetus during pregnancy (Björkman et al., 1996; Paré et al., 1996; Anderson et al., 1995; Schares et al., 1998; Davison et al., 1999; Lopez-Gatius et al., 2004a). Naturally infected cows can exhibit a rate of endogenous transplacental transmission as high as 95% (Davison et al., 1999) and this may occur during successive gestations (Björkman et al., 1996; Fioretti et al., 2003). Unlike toxoplasmosis, which stimulates protective immunity following primary infection, neosporosis can cause repeated abortion in cattle (Barr et al., 1993; Anderson et al., 1995; Williams et al., 2003). In addition, daughters born from serologically positive mothers show an increased risk of abortion compared to those born to serologically negative dams (Anderson et al., 1995; Paré et al., 1997; Hietala and Thurmond, 1999; Wouda et al., 1998; Moore et al., 2003; Lopez-Gatius et al., 2004b).

Outbreaks of *Neospora*-associated abortion in herds can be caused by point source infection by the parasite or by reactivation of the parasite in chronically infected cows. Avidity ELISA is useful to distinguish recent from chronic infections. Low levels of IgG antibodies are a sign of recent infection or reactivation, and titers tend to increase during chronic infection (McAllister et al., 2000; Dijkstra et al., 2002). In this study, the serological status of *Neospora* was monitored over a three-year period in animals older than 6 months in a dairy herd with a high prevalence of *N. caninum* and *N. caninum*-associated abortions. The aim of our study was to determine possible fluctuations in *Neospora* antibodies and to establish repeat abortion rates in seropositive and seronegative animals that remained in the herd throughout the study period. We also analyzed, rates of prevalence, abortion and repeat abortion for the entire herd.

Material and methods

Cattle and herd management

The data analyzed were derived from a herd showing the highest level of *Neospora* seroprevalence in our area of study recorded over the three year period (2001 to 2003). For the first, second and third study years, respectively, the total numbers of animals in the herd were 259, 222 and 231. Of these, 122 animals remained in the herd for all three years. The farm was free of dogs. Management practices have been described in a recent study on herds in Northeast Spain, including the herd examined here (Lopez-Gatius et al., 2005). Briefly, reared within the herds and kept in open stalls, the cows calved all year round and were milked three times daily. The herd is characterized by high yields (mean annual milk production for the study period was 10230 kg per cow), and the culling rate is 30% per year. All animals were tuberculosis and brucellosis free, as shown by yearly tests from 1985 to 2004. Vaccination programs were adopted for the

prevention of bovine virus diarrhea and infectious bovine rhinotracheitis. Animals between 6 and 8 months of age received modified live vaccines, whereas pregnant animals were administered killed vaccines during the 7th month of every gestation. Parous cows that did not become pregnant on day 150 postpartum received a further killed vaccine. All animals were bred by artificial insemination. Pregnancy diagnoses were performed on day 34 post-insemination by transrectal ultrasound, and by palpation per rectum on days 90 and 180. As from day 90, animals were visually inspected daily for signs of abortion until parturition, and only animals diagnosed pregnant on day 90, 0–365 days after a serological analysis were included in the study. Abortions occurring from gestation days 90 to 265 during the study period were recorded.

Serological tests

Blood samples to test for *Neospora* infection were collected during the annual screen for brucellosis. The samples were centrifuged and sera stored at -20°C until the time of analysis. Sera were tested for antibodies against *N. caninum* using the commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit CIVTEST anti-*Neospora* (Hipra, Girona, Spain). This test has been previously validated in our laboratory (Lopez-Gatius et al., 2004b).

In animals that were *Neospora* seronegative at the beginning of the study, and *Neospora* seropositive in any of the following years, an avidity test was performed (*Neospora* –Ab SVANOVIR®, Svanova, Sweden) to distinguish between recent or exogenous transplacentally transmitted infection, and chronic, endogenous transplacental infection. In addition, six *Neospora*-seropositive animals and 4 seronegative animals as previously established by the ELISA CIVTEST were tested by avidity ELISA to compare results.

Histopathology of aborted fetuses

Six aborted fetuses from seropositive animals and one aborted fetus from a seronegative cow were submitted for laboratory analyses. We looked for evidence of protozoal lesions in hematoxylin-eosin stained tissues consistent with multifocal necrosis associated with mononuclear inflammation. The presence of *N. caninum* was established by a specific immunohistochemical procedure (Lindsay and Dubey, 1989) and specific *Nc5* PCR performed in brain tissue (Liddell et al., 1999). Briefly, half the brain was fixed in 10% neutral buffered formalin and the remaining unpreserved brain tissue was stored at -20°C for DNA analysis. Paraffin-embedded histological sections were prepared and examined microscopically after staining with hematoxylin and eosin. For immunohistochemical staining, paraffin sections were reacted with an anti-*N. caninum* polyclonal antibody. When submitted fetuses were in autolytic conditions and lesions could not be examined, specific PCR analysis was always performed.

Statistical analysis

The following data were recorded for each animal: *Neospora* antibody titer, age, lactation number (pregnant heifers = lactation 0), abortion and repeat abortion (defined as abortion subsequent to a history of previous abortion during the same lactation period).

Analysis of the entire herd

Statistic analyses were performed using the SPSS version 12.0 program. Abortion rates for seropositive and seronegative animals were compared by the Chi-squared test. The possible effects of age and lactation number both on seroprevalence and abortion risk were analyzed by analysis of variance using the Tukey-Kramer and T-Dunnet tests for normal and non-normal distributions of the variable, respectively.

Animals in the herd for the three study years

The same analyses described above for the entire herd were performed on the animals remaining in the herd during the three study years. In addition, possible differences in mean *Neospora* antibody titers for each study year were assessed by analysis of variance. For all analyses, a $P < 0.05$ was considered significant. Values are expressed as the mean \pm standard deviation.

Results

Entire herd

The numbers of animals checked for *N. caninum* antibodies during each of the three years were 259, 222 and 231, respectively. Mean age and lactation number at first serological analysis were 40.4 ± 2.3 months (range 6 to 126 months) and 2.4 ± 1.9 lactations (range 0 to 9 lactations), respectively.

Table 1 shows the seroprevalence of *N. caninum* infection, and abortion and repeat abortion rates for the whole dairy herd recorded in the three consecutive years. The *Neospora* seroprevalence of the herd decreased from 31.7% in the first year to 24.8% to avoid reposition by seropositive animals in the herd. *Neospora* in the second year. Abortion rate dropped from 20.6% in the first year to 5.5% in the second. These decreases were the result of culling 37 animals in the herd, mainly *Neospora*-seropositive aborted animals, and of the use of beef bull semen to inseminate *Neospora*-seropositive dams seroprevalence underwent a further decrease in the third year (19.9%) although the total number of animals in the herd increased slightly, rendering an abortion rate of 9.9%.

414 pregnancies were diagnosed during the three study years: 290 pregnancies in seronegative animals and 124 in seropositive animals. The abortion rate in seropositive animals (39.5%) was significantly higher ($P < 0.0001$) than the rate recorded for seronegative animals (1.4%). 51% of all the abortions in seropositive animals were repeat abortions and these occurred in 36.8% of the animals with a previous history of abortion. Our analysis of seroprevalence and abortion in relation to age and lactation number revealed no statistically significant effects of these two factors.

All six fetuses from seropositive animals submitted for laboratory analysis showed lesions indicative of *Neospora* infection and/or presence of *N. caninum* DNA by PCR, while no lesions related to neosporosis and no parasite DNA were found in the aborted fetus from a seronegative animal.

Animals in the herd for the three study years

Of the 259 animals initially investigated, 122 (47.1%) remained in the herd for all three years of the study. Mean age and lactation number at first serological analysis were 39.8 ± 2.3 months (ranging from 6 to 126 months) and 1.8 ± 1.7 lactations (range 0 to 9 lactations), respectively. Of these 122 animals, 22 (18%) were seropositive in the first year of the study and 26 (21.3%) in the second and third years (Table 2). Four animals underwent seroconversion in the second year.

The 4 animals that were *Neospora* seronegative at the beginning of the study and *Neospora* seropositive the following years, were subjected to avidity ELISA along with 6 animals tested as *Neospora* seropositive and 4 as seronegative in all 3 study years. Of the four animals that underwent seroconversion, three were chronically infected; the nature of infection was unknown for the remaining cow due to an insufficient amount of material available for analysis. For the other control samples analyzed, the results of both techniques were in good agreement so seropositive animals were considered as chronically infected.

220 pregnancies were diagnosed during the three years: 171 in seronegative animals and 49 in seropositive animals (Table 2). Abortion occurred only in seropositive animals (26.5%), 61.5% of the total number of abortions in seropositive animals were repeat abortion and these occurred in 26.7% of the animals with a previous history of abortion. Of note was the finding that one animal with no history of abortion prior to 2001 aborted in the study's three consecutive years.

74 blood samples were recorded as *Neospora* positive, the mean antibody titer being 45.7 ± 28.5 units (range 6.1-103.4). Mean *N. caninum* antibody titers for the seropositive animals failed to differ over the three years (Table 2). Our analysis of the effects of age and lactation number on *Neospora* seroprevalence and abortion revealed no significant effects of these factors.

Discussion

The most significant findings of our study were the very stable pattern of *N. caninum* antibodies in chronically infected cows revealed by herd screening on a yearly basis and a high repeat abortion rate in *N. caninum*-seropositive cows. In seropositive animals persisting in the herd for the three years of the study period, antibody titers remained constant over the three years and 61.5% of all abortions were repeat abortions.

Neospora-seropositive animals are considered to remain seropositive during their lifetime (Hietala and Thurmond 1999; Davison et al, 1999) and high antibody titers against *Neospora* can persist for years (Stenlund et al., 2003). Fluctuations in antibody titers have been observed during gestation in several studies (Quintanilla-Gozalo et al., 2000; Maley et al., 2001; Trees et al., 2002). Hasler et al. (2006) observed that only 2 out of 30 seropositive animals and 1 out of 83 seronegative animals changed their serological status during pregnancy, indicating minor transient instability of anti-*N. caninum* antibody reactivity in adult cattle. In agreement with the latter study, our animals that were seropositive on initial screening remained seropositive for the three

consecutive study years. Whereas other authors found that eliminating seropositive animals from a herd, in which there was no relationship between *Neospora* and abortion, was not efficient at eradicating *Neospora* (Hernandez et al., 2002), in our study, yearly screening of the whole herd except for animals < 6 month old, was useful for monitoring *N. caninum* infection, as previously indicated by Dijkstra et al. (2003), Larson et al. 2004 and Lopez-Gatius et al. (2004a), for the purpose of adopting appropriate control measures. The control measures recommended to the farmer in the present study included culling seropositive animals with a previous history of abortion and insemination of seropositive dams with bull semen, to reduce the seroprevalence level in the herd, since hybrid calves were logically not used as replacements in the herds. In effect, the use of beef cow semen as the inseminate significantly reduces the risk of abortion in seropositive dairy cows (Lopez-Gatius et al., 2005). In the present study, *Neospora* seroprevalence in the herd was clearly reduced and the overall abortion rate decreased after the recommended control measures were established. A reflection of the good reproductive management of this herd was the fact that no seronegative animals aborted in the group that remained in the herd during the three years of the study.

In naturally infected animals, maternal immunity against infections acquired prior to pregnancy does not seem sufficient to prevent transplacental transmission to the fetus. Even when it has been demonstrated that a pre-existing infection can protect against an exogenous challenge, this immunity will not prevent endogenous transplacental transmission (Williams et al., 2003). Several studies have shown that cows with *N. caninum* antibodies (seropositive) are more likely to abort than seronegative dairy and beef cows (Paré et al., 1997; Thurmond and Hietala, 1997; Wouda et al., 1998; Waldner et al., 1998; Waldner et al., 1999; Moore et al., 2003; Lopez-Gatius et al., 2004b).

Finally, a chronically *N. caninum*-infected cow passes the infection to the fetus in successive pregnancies and may experience repeated abortion over her lifetime (Barr et al., 1993; Anderson et al., 1995). Anderson et al. (1995) concluded that a low proportion of cows (<5%) may have repeat abortions due to *Neospora caninum*. However, it has been observed that cattle repeatedly transmit the infection to their offspring and the re-abortion rate is similar to the abortion rate (Barr et al., 1993; Guy et al., 2001). In our study, a high repeat abortion rate was observed in *Neospora*-seropositive chronically infected dairy cows. In fact, with respect to the total number of seropositive animals with a previous history of abortion, 36.8% of abortions were recorded in the whole herd and 26.7% of abortions were registered in animals remaining in the herd over the three-year study period. Thurmond and Hietala, (1997) showed that an *N. caninum*-congenitally infected cows that had aborted previously carried a higher risk of subsequent abortion compared with congenitally infected cows that had not aborted previously. Similarly, Corbellini et al. (2006) recently observed that cows with a history of previous abortion were more likely (2.4 times) to abort an *N. caninum*-infected fetus than cows with no prior history of abortion. These results indicate that *N. caninum*-infected cows that abort are not able to develop adequate protective immunity (Thurmond and Hietala, 1997; Corbellini et al., 2006) and that the immunity provided by an initial infection is inadequate to prevent repeated abortion in mature cows. The elimination of cows undergoing 2 or more abortions would reduce the abortion rate in the herd.

In our study, the abortion rate was very high in seropositive animals throughout the three years of study (39.5%), indicating a causal link between *N. caninum* infection and

abortion in the herd. While in herds with horizontally transmitted infection, seropositive animals correspond to a certain age group (Dijkstra et al., 2001), the distribution of seropositive animals across the different age groups in our herd did not differ significantly, as has been observed in endemic herds (Davison et al., 1999). Besides, avidity ELISA results for animals undergoing seroconversion during the study indicated that most of these animals were chronically infected. Thus, vertical transmission was the main route of infection of the animals in this herd, despite the high abortion rate. Although, the herd was well managed and in good general health, it is possible that some animals were immunocompromised due to stress, concomitant illness and/or hormonal changes and this could have triggered the sudden recrudescence of latent neosporosis. Only 3.3% of the seronegative cows were seropositive in subsequent analyses. In several studies, a low rate of seroconversion in endemically infected herds has been observed, suggesting a low level of horizontal infection (Pare et al., 1996; 1997; Schares et al., 1998; Wouda et al., 1998; Davison et al., 1999a; Hietala and Thurmond, 1999; Lopez-Gatius et al., 2004a). In some of the present animals, antibody fluctuations in *Neospora* titers could account for the seroconversions detected.

As a general conclusion, *Neospora* seropositivity can be very stable over time and *N. caninum*-infected cows may show a high rate of repeat abortions. In infected herds, we recommend selective culling of cows undergoing repeat *N. caninum*-associated abortion, along with culling and/or reducing the number of daughters born to *Neospora*-seropositive cows that remain in the herd, by inseminating seropositive cows with beef bull semen. This would be a cost-effective strategy for minimizing the risk of abortion in a herd. Finally, our data reinforce the idea that a single yearly serological screen for *Neospora* is a simple method of monitoring *N. caninum* infection that is useful for establishing control measures at the farm level. More studies are, nevertheless, needed to identify the factors causing the recrudescence of *Neospora caninum* in well-managed dairy cows comprising a chronically infected herd.

Acknowledgements

The authors thank Ana Burton for assistance with the English translation. This study received financial support from the Spanish CICYT, grant AGL2004-06103-C02-01/02-GAN. Garcia-Ispuerto and Bech-Sabat were supported by the FPU grants from the Ministerio de Educación y Ciencia, AP-2004-4279 and AP-2005-5378, respectively.

References

- Anderson, M.L., Reynolds, J.P., Rowe, J.D., Sverlow, K.W., Packham, A.E., Barr, B.C., Conrad, P.A. 1995. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 210, 1169-1172.
- Barr, B.C., Conrad, P.A., Breitmeyer, R., Sverlow, K., Anderson, M.L., Reynolds, J., Chauvet, A.E., Dubey, J.P., Ardans, A.A. 1993. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J Am Vet Med Assoc.* 202,113-117.
- Björkman, C., O. Johansson, S. Sterlund, O. J. M. Holmdahl, A. Ugglå, 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1441-1444.

- Corbellini, L.G., Pescador, C.A., Frantz, F., Wunder, E., Steffen, D., Smith, D.R., Driemeier, D. 2006. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *Vet J.* 172, 114-120.
- Davison, H.C., Otter, A., Trees, A.J. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 29, 1683-1690.
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Wouda, W. 2001. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31, 209-215.
- Dijkstra, T.H., Barkema, H.W., Hessenlink, J., Wouda, W. 2002. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet. Parasitol.* 105, 89- 98.
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Eysker, M., Beiboer, M.L., Wouda, W. 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet. Parasitol.* 110, 161-169.
- Dubey, J.P. 2003. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89, S42- S56.
- Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W. 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol.* 134, 267-289.
- Fioretti, D., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V., Rosignoli, I. 2003. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 50, 399-404.
- Gondim, L.F., McAllister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 34, 159-161.
- Guy, C.S., Williams, D.J.L., Kelly, D.F., McGarry, J.W., Guy, F., Bjorkman, C., Smith, R.F., Trees, A.J. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec.* 149, 443-449.
- Hasler, B., Hernandez, J.A., Reist, M., Sager, H., Steiner-Moret, C., Staubli, D., Stark, K.D., Gottstein, B. 2006. *Neospora caninum*: Serological follow-up in dairy cows during pregnancy. *Vet Parasitol.* 137, 222-230.
- Hernandez, J., Risco, C., Donovan, A. 2002. Risk of abortion associated with *Neospora caninum* during different lactations and evidence of congenital transmission in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 221, 1742-1746.
- Hietala, S.K., Thurmond, M.C. 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serological responses in two dairies. *Int J Parasitol.* 29, 1669- 1676.
- Larson, R.L., Hardin, D.K., Pierce, V.L. 2004. Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 224, 1597-1604.
- Liddell, S., Jenkins, M.C., Dubey, J.P., 1999. A comparative PCR assay for quantitative detection of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 29, 1583-1588.
- Lindsay, D. S., and J. P. Dubey. 1989. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1981-1983.
- Lopez-Gatius, F., Lopez-Bejar, M., Murugavel, K., Pabon, M., Ferrer, D., Almeria, S. 2004a. *Neospora*-associated abortion episode over a 1-year period in a dairy herd in north-east Spain. *J. Vet. Med. B* 51, 348-352.

- Lopez-Gatius, F., Pabon, M., Almeria, S. 2004b. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 62, 606–613.
- Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J.L., Garbayo, J.M., Almeria, S. 2005. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. *J Vet Med B* 52, 88-92.
- Maley, S.W., Buxton, D., Thomson, K.M., Schriefer, C.E., Innes, E.A. 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. *Vet Parasitol.* 96, 1-9.
- 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*. *Int J Parasitol.* 28, 1473-1478.
- McAllister, M.M., Bjorkman, C., Anderson-Sprecher, R., Rogers, D.G. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J Am Vet Med Assoc.* 217, 881-887.
- Moore, D. P., C. M. Campero, A. C. Odeon, R. Chayer, and M. A. Bianco. 2003. Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. *J. Vet. Med. B* 50, 304-308.
- Paré, J., Thurmond M. C., Hietala S. K. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can.J. Vet. Res.* 60, 133–139.
- Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83, 82-87.
- Quintanilla-Gozaño, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L.M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int. J. Parasitol.* 30, 901-906.
- Schaes, G., Peters, M., Wurm, R., Barwald, A., Conraths, F.J. 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol.* 80, 87-98.
- Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Ugglå, A., Björkman, C. 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 85, 227–234.
- Stenlund, S., Kindahl, H., Ugglå, A., Björkman, C. 2003. A long term study of *Neospora caninum* infection in a Swedish dairy herd. *Acta Vet. Scand.* 44, 63-71.
- Thurmond, M.C., Hietala, S.K. 1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58, 1381-1385.
- Trees, A.J., McAllister, M.M., Guy, C.S., McGarry, J.W., Smith, R.F., Williams, D.J. 2002. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet Parasitol.* 109, 147-154.
- Wouda, W., Brinkhof, J., Van Maanen, C., de Geer, A.L., Moen, A.R. 1998. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds, a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 711-716.
- Waldner, C. L., E. D. Janzen, and C. S. Ribble. 1998. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213, 685-690.

- Waldner, C. L., E. D. Janzen, J. Henderson, and D. M. Haines. 1999. Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215, 1485-1490.
- Williams, D.J.L., Guy, C.S., Smith, R.F., Guy, F., McGarry, J.W., McKay, J.S., Trees, A.J. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 33, 1059-1065.

Table 1. Seroprevalence of *N. caninum* infection, abortion and repeated abortion rates in a complete dairy herd during three consecutive years.

Year	Total animals	Seropositive animals (%)	Total no. of pregnancies (seropositive) ^a	Total no. of abortions (%)	Abortions in seropositive animals (%) ^b (%) ^c	Seropositive animals with previous history of abortion	Repeated abortion in seropositive animals (%) ^d (%) ^e
1	259	82 (31.7)	165 (65)	34 (20.6)	31 (47.7) (91.2)	35	18 (58.1) (51.4)
2	222	55 (24.8)	128 (32)	7 (5.5)	7 (21.9) (100)	23	4 (57.1) (17.4)
3	231	46 (19.9)	121 (27)	12 (9.9)	11 (40.7) (91.7)	10	3 (27.3) (30)
Total	712	183 (25.7)	414 (124)	53 (12.8)	49 (39.5) (92.5)	68	25 (51) (36.8)

^aTotal number of seropositive pregnant animals

^bWith respect to the total number of seropositive pregnant animals.

^cWith respect to the total number of abortions.

^dWith respect to the total number of abortions in seropositive animals.

^eWith respect to the total number of animals with previous history of abortion.

Table 2. Seroprevalence of *N. caninum* infection, antibody titres and abortion and repeated abortion rates in 122 animals which remained in a dairy herd during three consecutive years.

Year	Seropositive animals (%)	Antibody titres in seropositive animals ^a (mean \pm S.D.)	Total no. of pregnancies	Total no. of pregnancies in seropositive animals	Abortions in seropositive animals ^b (%)	Seropositive animals with previous history of abortion	Repeated abortion in seropositive animals (%) ^c (%) ^d
1	22 (18)	45.8 \pm 30.4	73	17	6 (35.3)	8	3 (50) (37.5)
2	26 (21.3)	47.1 \pm 30	75	15	1 (6.7)	11	1 (100) (9.1)
3	26 (21.3)	44.3 \pm 26.1	72	17	6 (35.3)	11	4 (66.7) (36.4)
Total	74 (20.2)	45.7 \pm 28.5	220	49	13 (26.5)	30	8 (61.5) (26.7)

^aMean values were not different throughout the three years of study.

^bNo abortions were registered in seronegative animals.

^cWith respect to the total number of abortions in seropositive animals.

^dWith respect to the total number of animals with previous history of abortion.

IV. DISCUSIÓN GENERAL

La neosporosis es considerada en la actualidad como una de las principales causas de aborto en ganado vacuno de todo el mundo (Anderson et al., 2000; Dubey, 2003; Dubey et al., 2006). En concreto, en España, tras la descripción del primer caso de aborto en ganado vacuno (Fondevila et al., 1998) los estudios de seroprevalencia en diferentes regiones han puesto de manifiesto la amplia difusión de la infección en los rebaños con tasas de entre 33% y 63% de los rebaños afectados (Quintanilla-Gozalo et al., 1996; Mainar-Jaime et al., 1999; Bartels et al., 2006), siendo especialmente importante la alta prevalencia de infección en fetos abortados con tasas de entre el 32% al 57% (Gonzalez et al., 1999; Pereira-Bueno et al., 2003). Todos estos datos indican la importancia de la infección por *Neospora caninum* en el ganado vacuno de España. En la zona Noreste de España, en concreto en Cataluña no se había estudiado esta enfermedad.

Ante la presentación de un aumento importante de la tasa de aborto en una explotación ganadera de alta producción lechera de Lleida en la que anteriormente se habían observado tasas de aborto consideradas no asociadas a problemas infecciosos (se pasó de un nivel medio del 10% de aborto en años anteriores y mayoritariamente en los primeros 90 días a un 23,2% de abortos a lo largo de 1 año, y la mayoría de los abortos en el segundo trimestre) se sospechó la posibilidad de que la causa de dicho brote fuera neosporosis, dado el excelente control de otras causas de aborto en la explotación. Para ello realizamos un estudio retrospectivo basado en análisis reproductivos, serológicos y la puesta en evidencia del parásito mediante técnica de PCR en dos fetos, los únicos disponibles en el momento del estudio. Estos análisis permitieron establecer que el 44% de las vacas seropositivas abortaron en el período de estudio. De los animales que abortaron el 76,3% fueron *N. caninum* seropositivos y el riesgo de aborto fue 12,2 veces mayor en los animales seropositivos comparados con los seronegativos. El análisis en fetos confirmó la presencia de *Neospora* en los tejidos de los fetos analizados.

El diagnóstico de *N. caninum* en los rebaños no es sencillo, pero el establecimiento de una relación clara de la seropositividad frente el parásito en los animales que abortan comparada con los animales seronegativos en el rebaño permite establecer este nexo causal (Dubey y Schares, 2006). La presencia de DNA en los fetos confirmó esta relación. La patogénesis de la infección por *N. caninum* es compleja y escasamente conocida y es importante conocer la vía de transmisión de la infección en el rebaño. Las pérdidas por *N. caninum* pueden ocurrir como consecuencia de la infección maternal durante la gestación (infección transplacentaria exógena) pero más frecuentemente son consecuencia de la reactivación de infecciones crónicas en la hembra gestante (infección transplacentaria endógena) (Trecs y Williams, 2005). El estudio serológico a nivel de rebaño completo, en animales de varias generaciones, madres y sus hijos/hijas evidenció a la transmisión transplacentaria endógena, mayor al 90%, como la vía de transmisión más importante en el mantenimiento de la infección en este rebaño.

Posteriores estudios en otros rebaños incluidos en esta tesis (capítulo II) han permitido concluir que la vía transplacentaria endógena es la principal en los rebaños de nuestra zona. Sólo se observó un pequeño número de animales en los que el estado seropositivo de las hijas no coincidía con sus madres, indicando un pequeño porcentaje de transmisión horizontal en el rebaño. Como dato de interés este rebaño había estado libre de perros en los últimos 7 años. Este pequeño porcentaje de transmisión transplacentaria exógena, con niveles de aproximadamente un 8,5% ha sido indicado en otros estudios en rebaños infectados de manera enzoótica (Paré et al., 1997; Davison et al., 1999).

La distribución de los animales seropositivos en este rebaño no se relacionó con la edad, por lo que todo pareció indicar que el aumento en la tasa de aborto se produjo por un factor posiblemente inmunosupresor que indujo la reactivación parasitaria en los animales crónicamente infectados con anterioridad, de acuerdo con los resultados de otros autores (Wouda et al., 1999; Atkinson et al., 2000).

Otra observación del estudio (Capítulo I) fue que el aborto tuvo lugar mayoritariamente en el segundo trimestre de gestación, lo cual coincide con los estudios de otros grupos, que indican que *N. caninum* puede causar abortos desde 3 meses a final de gestación pero la mayoría de los abortos tiene lugar a los 5-7 meses de gestación (Anderson et al., 1991; Thornton et al., 1991; Wouda et al., 1997). Posteriores análisis en un número mayor de rebaños (Capítulo II) corroboraron y extendieron estos resultados asociados a *N. caninum* en los rebaños de la zona.

Fue interesante constatar que factores que han sido considerados factores de riesgo importantes en la zona tales como paridad de los animales o época de gestación, no se evidenciaron como factores de riesgo en presencia de la infección por *Neospora*, por lo que parecen quedar enmascarados ante dicha infección. Este aspecto se analizó en más detalle en el capítulo II en más rebaños de la zona y los resultados se confirmaron. Mientras en los abortos que tienen lugar en los primeros 90 días de gestación, no asociados con *Neospora*, estos factores de riesgo son los más importantes en los rebaños de la zona de estudio, en los que tienen lugar tras 90 días, relacionados con la infección por *Neospora*, la única variable considerada factor de riesgo es la propia infección por el parásito.

El establecimiento de una relación directa entre el aborto y la presencia de anticuerpos por *Neospora* ha de ser muy cuidadosa dado que *Neospora* es un parásito muy bien adaptado al ganado con una transmisión transplacentaria muy eficiente, y que en un cierto número de animales seropositivos no produce abortos. La serología positiva frente *N. caninum* en una hembra que ha abortado en principio sólo indica que *Neospora* podría estar asociada en el aborto y en estos casos individualizados el diagnóstico ha de sustentarse en la demostración de infección en el feto (Jenkins et al., 2000). Es por ello que para el establecimiento de la infección de *N. caninum* como causa de un brote de aborto es necesario el estudio de los rebaños completos y la observación de una relación del aborto en las hembras seropositivas. Siguiendo esta metodología, analizamos los factores de riesgo que influyen la infección por *N. caninum* en las granjas de nuestra zona que presentaron historial de problemas reproductivos (Capítulo II). Todos los animales de los rebaños estudiados estaban libres de brucelosis y estaban sometidos a un excelente control reproductivo, necesario para su alta producción lechera. Se evaluó el efecto de la infección por *Neospora* mediante análisis serológico y su relación con la presencia de aborto en un total de 2773 gestaciones analizadas. El estudio confirmó de nuevo la importancia de los abortos por *Neospora* en el segundo trimestre de gestación ya indicado con anterioridad pero se incidió en un aspecto poco conocido como es el efecto de la infección por *N. caninum* en el primer trimestre de gestación. Los resultados de este estudio pusieron en evidencia que en infecciones crónicas de *Neospora* previas a la gestación, la parasitación no tiene efecto en el periodo fetal temprano pero tiene un claro efecto abortivo tras los 90 días de gestación. En los abortos ocurridos antes de los 90 días de gestación, los principales factores de riesgo fueron la paridad de los animales, mayor riesgo en animales con partos previos comparados con novillas, y en las gestaciones en las épocas cálidas con mayor riesgo que en épocas templadas, que como ya se ha indicado son los factores de riesgo habituales en la zona cuando *N. caninum* no está involucrada en los cuadros de aborto. Por el contrario, tras los 90 días el único factor de riesgo incluido en el modelo de regresión múltiple fue la serología positiva a *Neospora* con un riesgo de

aborto 18,9 (rango desde 12,9 a 27,8) veces mayor en animales seropositivos, y un 71,9% de los animales que abortaron fueron seropositivos, confirmando los resultados previos (Capítulo I) y poniendo en evidencia a *Neospora* como una de las principales causas de aborto en la zona.

Los resultados por tanto sugieren que en infecciones crónicas por *N. caninum* ya previas a la gestación, dicha infección no afecta al periodo fetal temprano pero sí tiene un importante efecto abortivo tras los 90 días de la gestación. Este hecho se ha visto confirmado por un estudio en el que se ha observado que la infección por *N. caninum* no afecta la fertilidad de los animales (Lopez-Gatius et al., 2005a).

La falta de efecto de la infección por *N. caninum* en los animales crónicamente infectados previamente a la gestación, puede tener dos explicaciones: 1) en los estados iniciales de gestación los taquizoitos en placenta o feto no alcanzan suficiente número para causar daños en los mismos o producir abortos pero sí que son capaces de causar ese daño en periodos posteriores cuando se replican en mayor cantidad, o 2) hay una migración repentina del parásito a través de la sangre en el segundo trimestre de gestación, cuando se ha observado que el sistema inmune de la vaca gestante puede estar debilitado (Innes et al., 2001). Long and Baszler (1996) no fueron capaces de identificar taquizoitos en la placenta y tejidos fetales en estadios pre-gestación y en estadios iniciales de la misma en ratones infectados experimentalmente con *Neospora*, pero pudieron detectarlos a partir de mediados de gestación.

La tasa de abortos fue mayor en el segundo trimestre también comparada con la tasa en el tercer trimestre. Durante el segundo trimestre, la inmunodepresión de la respuesta celular o el fallo de la madre en producir una adecuada respuesta inmune, más que el fallo de la respuesta fetal que es ya funcional, parece ser críticos para la supervivencia de los fetos (Pare et al., 1997; Osburn et al., 1982).

Nuestros resultados indican que la presencia de anticuerpos frente *N. caninum* en el ganado vacuno pueden utilizarse como indicador de aborto en los animales tras los 90 días de gestación y dada la similitud con otros estudios sobre aborto causado por *Neospora* (Moen et al., 1998; Pare et al., 1997; Dubey et al., 1997; Thurmond et al., 1997) indican una gran consistencia de la patogénesis del aborto causado por *Neospora* en diferentes condiciones de manejo y de sistemas productivos en todo el mundo.

Una vez puesta en evidencia la presencia de *N. caninum* en los rebaños de Cataluña se procedió a comparar dos técnicas serológicas de ELISA comerciales disponibles en el momento del estudio (Capítulo III). Herdcheck de laboratorios IDEXX y CIVTEST de laboratorios Hipra en 5 rebaños completos en un total de 2435 animales para analizar los niveles de seroprevalencia en los rebaños de la zona afectada y para decidir cual de las dos técnicas sería más adecuada para el análisis de la presencia de anticuerpos frente *N. caninum* en posteriores estudios.

En ausencia de signos clínicos de infección por *Neospora* (en ganado adulto) el diagnóstico en los animales vivos es la única posibilidad de conocer la relación de los animales con la infección. El estudio de las causas de aborto en los fetos, sería realmente el primer estudio a tener en cuenta, pero desafortunadamente debido al manejo de las explotaciones y a pesar de los esfuerzos por obtener tejidos de los fetos abortados muchas veces resulta imposible contar con este tipo de muestras en el momento del aborto. El estudio en fetos en esta tesis fue reducido y sólo sirvió para confirmar los estudios serológicos, y por ello sólo son citados brevemente.

Para detectar anticuerpos a *N. caninum* en los rebaños existen varios tipos de pruebas que han utilizado antígeno procedentes de taquizoitos: IFI (Inmunofluorescencia indirecta), NAT (Técnica de aglutinación), Immunoblot, rELISA (ELISA recombinante), iscomELISA... En particular en la técnica de ELISA se han utilizado taquizoitos enteros o fijados, extracto soluble total detergente o acuoso, antígenos recombinantes y muchos de los test ELISA comerciales para diagnóstico de *Neospora* utilizan antígeno total de taquizoitos lisados por sonicación, como en el caso del ELISA IDEXX o del ELISA CIVTEST. Para evitar la variabilidad que se pueden presentar en los resultados utilizando diferentes preparaciones de antígenos (Jenkins et al., 2000) se decidió utilizar en paralelo los dos test antes mencionados para hacer un diagnóstico más acertado dada la ausencia de un "gold estándar" para el diagnóstico de *Neospora* y sin referencias previas de infección en la zona estudiada de la técnica de IDEXX (Paré et al., 1995). El ELISA IDEXX ha sido ampliamente utilizado en estudios previos al nuestro (Schares et al., 1999; Wouda et al., 1998; Bartels et al., 2005; Schares et al., 2004; Von Blumröder et al., 2004) para el diagnóstico específico de abortos y/o obtención de información sobre la infección con posibilidad de identificar los animales seropositivos y la vía de transmisión de la infección en los rebaños (Pare et al., 1995; Pare et al., 1997). Por su parte, el ELISA CIVTEST, más reciente en el mercado (Rebordosa et al., 2000), ha sido comparado en estudios recientes en paralelo con diferentes técnicas y otras técnicas de ELISA comerciales incluyendo IDEXX, observando en todos los estudios una concordancia excelente entre el ELISA CIVTEST y otras técnicas así como entre los dos ELISAS (Bartels et al., 2006; Björkman et al., 2006; Cactano et al., 2004)

Mediante el análisis estadístico del valor kappa se pudo observar una concordancia muy elevada entre ambas técnicas serológicas, lo que permitiría su empleo de manera indistinta en futuros estudios. Únicamente se pudieron observar pequeñas discrepancias en algunas muestras. El análisis de las muestras discordantes en los ELISAs mediante IFI, no ayudó a descifrar cuál de los dos ELISA permitía una mejor verificación de las muestras discordantes que eran realmente positivas o no. Aunque la técnica IFI ha sido considerada como prueba referencia en numerosos estudios, la IFI tampoco puede ser considerada como una técnica "Gold standard" (Frossling et al., 2003). En cualquier caso, el número de muestras discordantes fue muy reducido en el total de muestras analizadas, indicando claramente una alta concordancia en ambos ELISA. En el caso de estos animales con resultados dudosos, un seguimiento de los mismos con muestreos posteriores a lo largo del tiempo ayudaría a reconocerlos como claramente seropositivos o seronegativos en los rebaños. La elevada concordancia entre los dos test ha sido observada también en un reciente estudio de comparación de técnicas serológicas a nivel multinacional realizado recientemente en Europa (Von Blumröder et al., 2004) y ha permitido la validación del test local de laboratorios Hipra. Ambas técnicas tienen elevados niveles de sensibilidad y especificidad y aunque se pueden utilizar de manera indistinta, hemos continuado los estudios con el kit local por la facilidad de obtención del mismo.

La excelente correlación de resultados entre ambas técnicas hizo que no se considerase necesario plantear diferentes puntos de corte a los recomendados. Estudios por otros equipos utilizando el ELISA CIVTEST han utilizado diferentes puntos de corte superiores al recomendado por la casa comercial obteniendo una concordancia igualmente alta entre ambas técnicas lo que permite su uso en paralelo en estudios epidemiológicos (von Blumröder et al., 2004). La diferencia en los puntos de corte en función de los laboratorios es un aspecto a tener en cuenta en la estandarización de las técnicas. Considerando animales positivos aquellos que lo eran en las dos técnicas de ELISA se pudo constatar que todos los rebaños analizados presentaron algún animal con

anticuerpos frente *N. caninum*. Ello evidenció la gran diseminación de la infección por *N. caninum* en la zona. Las tasas de prevalencia variaron mucho entre rebaños, siendo elevadas en algunos y bajas en otros. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la neosporosis en Cataluña y que en casos de aborto el estudio de la neosporosis debe ser incluida en los protocolos de diagnóstico.

Un dato interesante fue el hecho de que aunque las tasas de prevalencia en los rebaños variaron mucho entre ellos en todos ellos la relación de seropositividad frente *N. caninum* y los abortos fue clara, incluso en los rebaños con bajas prevalencias.

El aborto es el principal síntoma clínico asociado a la infección por *Neospora* en ganado vacuno lechero, aunque no está claro el cómo y el porqué ocurre. Si se conoce con mayor exactitud cuando ocurre la mayoría de abortos y este conocimiento es clave para entender la patogenicidad y poder acercarnos más a las causas del aborto, su prevención y control.

El sistema inmune del feto en etapas iniciales no es capaz de reconocer, responder ni evitar el crecimiento parasitario por lo que durante el primer tercio de gestación el feto es muy vulnerable a la infección por *Neospora* (Dubey 2003) y no podría sobrevivir a la infección (revisado Dubey et al., 2006). Como se ha observado en infecciones experimentales con taquizoitos vía intravenosa al inicio de la gestación (70 días) esta infección ocasiona en la mayoría de los casos muerte fetal (Macaldowie et al., 2004; Williams et al., 2000; Williams et al., 2003). El feto empieza a desarrollar una respuesta inmune en el segundo tercio de gestación que sin embargo no es protectora pues los abortos por *N. caninum* tienen lugar mayoritariamente en este período y pueden tener lugar hasta finales de gestación (Anderson et al., 1991; Barr et al., 1991; Otter et al., 1995; Wouda et al., 1997; Hattel et al., 1998). En nuestros estudios la tasa de abortos en animales seropositivos a *N. caninum* fue significativamente mayor en el segundo tercio de gestación.

Se han observado fluctuaciones en los anticuerpos en vacuno infectados natural y experimentalmente (Jenkins et al., 1997; Dubey et al., 1997; Quintanilla-Gozalo et al., 2000). No se conoce todavía si estas fluctuaciones son debidas a estímulos antigénicos por reactivación de infecciones latentes o por reinfecciones a partir de una fuente externa. En concreto, durante la gestación la interacción entre el sistema inmune y el parásito parece dar lugar a picos de subida y bajada de anticuerpos. En ocasiones estos niveles incluso se encuentran por debajo de los niveles umbral de detección de positividad en las técnicas habituales (Stenlund et al., 1999; Guy et al., 2001; Sager et al., 2001; Maley et al., 2001; Trees et al., 2002).

En las vacas que no abortan, las titulaciones medias de anticuerpos para *N. caninum* aumentan durante la gestación media y disminuyen hacia los dos meses antes del parto (Conrad et al., 1993; Paré et al., 1998; Stenlund et al., 1999; Guy et al., 2001). Este aumento de anticuerpos hacia la mitad de la gestación se ha asociado con infección transplacentaria espontánea o reactivación parasitaria. En el caso de animales que abortan se observa un aumento de los anticuerpos antes del aborto (Guy et al., 2001). En nuestro estudio obtuvimos similares observaciones a las de estos autores al analizar la dinámica de los anticuerpos en animales gestantes a lo largo de la gestación (Capítulo IV) en animales seropositivos que habían presentado historia de abortos previos. En concreto, la mayoría de los animales previamente seropositivos (14 de 16) mantuvieron niveles por encima del umbral de seropositividad durante toda la gestación. Los niveles de anticuerpos siguieron una dinámica general caracterizada por un aumento del nivel de anticuerpos hacia el segundo tercio de gestación, alcanzando un máximo a los 150-

210 días de gestación y posteriormente un leve descenso antes del parto. Este modelo se observó tanto en animales seropositivos que abortaron a lo largo del estudio como en los seropositivos que no lo hicieron, de acuerdo con previos estudios que han indicado un patrón de anticuerpos similar tanto en los animales abortados y en los que no (Quintanilla- Gonzalo et al., 2000).

Aunque el patrón de anticuerpos a lo largo de la gestación fue similar tanto en las hembras que abortaron como las que no abortaron, las que abortaron presentaron un pico en los anticuerpos coincidiendo con el momento del aborto lo que podría asociarse con una reactivación del parásito en animales ya infectados. Se podría especular que la inmunosupresión inducida en la preñez podría reactivar los quistes parasitarios en los tejidos causando una parasitemia. La elevación de anticuerpos a los 4 a 5 meses antes del parto, sugiere que posiblemente éste sea el momento de la reactivación de una infección latente.

Otro aspecto analizado en esta tesis ha sido la importancia de la repetición de aborto en los animales infectados por *N. caninum* (Capítulo V). No existían muchos estudios previos analizando la tasa de abortos repetitivos en animales infectados por *Neospora*. Anderson et al. (1995) concluyeron que una pequeño porcentaje (<5%) podían tener abortos repetitivos causados por *Neospora*. Sin embargo, se ha podido observar en otros estudios que las vacas pueden transmitir la infección de manera repetitiva a sus crías en sucesivas gestaciones y la tasa de re-aborto es similar a la de aborto (Barr et al., 1993; Guy et al., 2001). Para ello analizamos un rebaño con alta seroprevalencia de infección y de abortos relacionados con *N. caninum* durante 3 años consecutivos. Un total de 122 animales permanecieron en el rebaño durante los 3 años y por tanto fueron muestreados 3 años consecutivos. En el rebaño completo la tasa de repetición de aborto tuvo lugar en un 51% de los animales en relación con el número total de abortos y en un 36,8% con respecto a los animales totales en el rebaño que habían presentado historia previa de abortos. Por su parte en el grupo de 122 animales que se muestrearon todo los 3 años de estudio el aborto sólo tuvo lugar en animales seropositivos, y la repetición de aborto tuvo lugar en el 61,5% del total de abortos en este grupo y en el 26,7 se trataba de animales con historial previo de abortos. Fue interesante observar abortos consecutivos durante los 3 años en un animal sin historial previo de abortos.

En nuestro estudio, un elevado porcentaje de vacas repitieron aborto, de hecho en relación con los animales seropositivos totales en el rebaño con historial previo de aborto un 36,8% de los animales en el rebaño entero y un 26.7% en el grupo muestreado durante 3 años sufrieron abortos repetitivos. Elevadas tasas de abortos repetitivos en vacas infectadas por *N. caninum* han sido observados por Thurmond and Hietala, (1997) y más recientemente por Corbellini et al., (2006) que han observado que vacas congenitamente infectadas que habían abortado con anterioridad tienen más riesgo de abortar de nuevo que aquellas que no habían tenido abortos previos, y por tanto indican que la infección por *Neospora* no induce suficiente protección en los animales infectados crónicamente para que éstos sean inmunes al aborto tras un primer caso de aborto, como es el caso en *Toxoplasma*.

En el grupo de 122 animales, aquellos animales seropositivos el primer año de estudio continuaron siéndolo el segundo y tercero, y sólo 4 animales seronegativos el primer año seroconvirtieron en el segundo y permanecieron seropositivos el tercer año de estudio, demostrando una gran estabilidad de la seropositividad de los animales infectados por *N. caninum* a lo largo del tiempo, Hasler et al., (2006) observaron que sólo 2 de 30 animales seropositivos y 1 de 83 animales seronegativos

cambiaron su estado de seropositividad-seronegatividad durante la gestación y por tanto conjuntamente con nuestros resultados, parece indicarse un modelo muy estable de anticuerpos frente *N. caninum* en ganado vacuno adulto. A su vez, estos resultados corroboran nuestra inicial apreciación (Capítulo I) de que la serología materna basada en análisis de rebaños completos es un buen indicador del riesgo de aborto en la neosporosis, y permite conocer el estado de infección en los rebaños para el establecimiento de medidas de control en los mismos. Las medidas de control propuestas en nuestro caso en un rebaño con alta incidencia de abortos (Capítulo V) fueron la retirada del rebaño de animales seropositivos que hubieran abortado previamente y la inseminación con semen de vacuno de carne. La inseminación de las vacas lecheras seropositivas con semen de vacuno de carne, especialmente con la raza Limousin, además de tener como aspecto práctico no dejar reposición seropositiva en el rebaño, reduce de manera significativa el riesgo de aborto en las mismas (López-Gatius et al., 2005b, García-Ispuerto et al., 2005). Este efecto podría deberse a una menor transmisión trans-placentaria del parásito en razas de carne o a una mejora de la función placentaria. La aplicación de estas medidas permitió reducir significativamente la seroprevalencia en el rebaño que pasó de un 37,1% el primer año al 24,8 el segundo y al 19,9% el tercero así como la reducción de la tasa de aborto en el mismo que a su vez disminuyó de un 20,6 el primer año al 5,5% el segundo y fue de un 9,9 el tercero.

Por tanto, el muestro anual de todo el rebaño, coincidiendo con las épocas de campañas sanitarias de brucelosis en las explotaciones, ha demostrado ser útil para establecer planes de control de la infección por *Neospora* y reducir de manera muy significativa las tasas de abortos en aquellos en los que se han establecido (Capítulo V).

Referencias

- Anderson MI., Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. JAVMA; 198:241-4.
- Anderson ML, Andrianaivo AG, Conrad PA. 2000. Neosporosis in cattle. Anim Reprnd Sci 2000; 60(6):417-31.
- Anderson MI., Reynolds JP, Rowe JD, Sverlow K W, Packham A F, Barr BC, Conrad PA. 1995. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 210. 1169-1172.
- Atkinson R A, K W Cook, I. A Reddacliff, J Rothwell, K W Broady, P Harper, F J Ellis. 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. Aust. Vet. J. 78, 262-266.
- Bartels CJ, van Maanen C, van der Meulen AM, Dijkstra T, Wouda W. 2005. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. Vet Parasitol. Aug 10; 131:3-4,235-46
- Bartels CJ, Améz-Seeo JI, Ruiz-Santa-Quiteria A, Björkman C, Frossling J, von Blumroder D, Conraths FJ, Schares G, van Maanen C, Wouda W, Ortega-Mora LM. 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. Vet Parasitol. 137, 17-27.
- Barr BC, Anderson MI., Dubey JP, Conrad PA. 1991. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet Pathol;28:110-6.
- Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson MI., Reynolds J, Chauvet AF, Dubey JP, Ardans AA. 1993. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora* infected fetuses: Four cases (1990-1992). J Am Vet Med Assoc. 202,113-117.
- Björkman C, Alvarez-García G, Conraths FJ, Mattsson JG, Ortega-Mora LM, Sager H, Schares G. 2006. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. Vet Parasitol. 2006;140(3-4):273-80.
- Caetano-da-Silva A, Ferre I, Aduriz G, Alvarez-García G, del-Pozo I, Atxaerandio R, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM. 2004. *Neospora caninum* infection in breeder bulls: seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. Vet Parasitol. 124(1-2):19-24

Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, Bordenaut R, Tuter G, Breitmeyer B, Palmer C, Thurmond M, Ardans A, Dubey JP, Dubanel G, Barr B. 1993. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diag Invest* 5:573-578.

Corbellini, L.G., Pescador, C.A., Frantz, F., Wunder, E., Steffen, D., Smith, D.R., Driemeier, D. 2006. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *Neospora caninum* infection: importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. *Vet J.* 172, 114-120.

Davison HC, Otter A, Trees AJ. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 29, 1683-1690.

Dubey JP, Jenkins MC, Adams DS, McAllister M, Anderson-Sprecher R, Baszler TV. 1997. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J Parasitol*;83:1063-9.

Dubey JP. 2003. Neosporosis in cattle. *J. Parasitol.* 89,542- 556.

Dubey JP, Buxton, D, Wouda W. 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol.* 134, 267-289.

Dubey JP and Sotares G. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol.* Aug 31;140.1-2.1-34.

Fondevila D, Añor S, Pumarola M, Dubey JP. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. *Vet Parasitol* 1998;77:187- 9.

Frossling J, Bonnett B, Lindberg A, Bjorkman C. 2003. Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. *Prev Vet Med.* 20;57(3):141-53.

García-Ispicito I, López-Gátius F, Santolaria P, Yaniz J, Noguera C, Pabón M, López-Béjar M, Almería S. 2005. The use of Limousine bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora* seropositive dairy cows. COST #54 Annual Meeting "Reservoirs of protozoan abortifacients in livestock and wildlife". Working Group 4 "Epidemiology, risk assessments, economics and control. *Wiadomości Parazytologiczne*, tom 51 suplement, pag 42-43

Gonzalez I, D. Buxton R, Atxaerandio, G, Aduriz, S, Maley, Marco JC. 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet. Rec.* 144, 145-150

Guy CS, Williams DJL, Kelly DF, McGarry JW, Guy F, Bjorkman C, Smith RE, Trees AJ. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec.* 149, 443-449.

Hassler B, Hernandez JA, Reist M, Sager H, Steiner-Moret C, Staubli D, Stark KD, Gottstein B. 2006. *Neospora caninum*: Serological follow-up in dairy cows during pregnancy. *Vet Parasitol* 137, 222-230.

Hattel AL, Castro MD, Gumma JD, Weinstock D, Reed JA, Dubey JP. 1998. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet Parasitol*;74:307-13.

Innes EA, Wright S, Maley S, Rae A, Kiryar E, Bertley P, et al. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol*; 31:1523-34.

Jenkins MC, Wouda W, Dubey JP. 1997. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clin Diagn Lab Immunol.*3:270-4

Jenkins MC, Caver JA, Bjorkman C, Anderson TC, Rounand S, Vinyard B, Uggla A, Thullier P, Dubey JP. 2000. Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. *Vet Parasitol.* 94.1-2.17-26

Long MT and Baszler TV. 1996. Fetal loss in BALB/c mice infected with *Neospora caninum*. *J Parasitol* ;82(4):608-11.

Lopez-Gatius F, Santolaria P, Almería S. 2005a. *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions. *J Vet Med B* 2005 52(1):51-53.

Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz JL, Garbajo JM, Almería S. 2005b. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. *J Vet Med B* 52, 88-92.

Mañar-Jaime RC, Thurmond MC, Berzal-Herranz B, Higuera SK. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet Rec.*145:72- 5.

- Maley SW, Buxton D, Thomson KM, Schriefer CE, Innes EA. 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. *Vet Parasitol.* 96, 1-9.
- Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, Innes EA. 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. *J Comp Pathol.* Aug-Oct;131:2-3.142-56
- Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EAM, Van Werven T. 1998. Increased risk of aborting following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology.* 49:1301-9.
- Osburn BI, MacLachlan NJ, Terrel IG. 1982. Ontogeny of the immune system. *JAVMA.* 181:1049-52.
- Otter A, Jeffrey M, Griffiths B, Dubey JP. 1995. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Vet Rec.* 136:602-6.
- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83, 82-87.
- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. 1995. An enzyme-linked immunosorbent (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* spp. infection in cattle. *J. Vet. Diag. Invest.* 7: 352-359.
- Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. 1998. Seroprevalence study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc.* Dec 1;213.11.1595-8
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Álvarez-García G, Collantes-Fernández, E, Ortega-Mora, M.L. 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 111, 143-152.
- Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Seijas-Carballido A, Costas E, Ortega-Mora L.M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int. J. Parasitol.* 30, 901-906.
- Quintanilla-Gozalo MA, Pereira-Bueno JM, Seijas-Carballido A, De la Fuente R, Ortega Mora LM. 1996. Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Neospora* sp en un rebaño bovino con antecedentes de aborto. IV Congreso Internacional de Medicina Bovina-Ancarbe. Octubre 2-6. p 107.
- Rebordosa X, Álvarez-García G, Collantes E, Ortega L.M, Artigas C. 2000. Desarrollo de un ELISA indirecto para la valoración de anticuerpos contra *Neospora caninum*. *Laboratorio Veterinario, Avedilla* 17, 5-8.
- Sager H, Fischer I, Furrer K, Strasser M, Waldvogel A, Boerlin P, Audige I, Gottstein B. 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet Parasitol.* Dec 3;102.1-2.1-15
- Schaes G, Conraths FJ, Reichel MP. 1999. Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *Int. J. Parasitol.* 29 1659-1667
- Schaes G, Harwald A, Staubach C, Wurm R, Rauser M, Conraths FJ, Schroeder C. 2004. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Vet Parasitol.* Feb 26;120.1-2.55-63
- Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Björkman, C. 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 85, 227-234.
- Thomson RN, Thompson EJ, Dubey JP. 1991. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *NZ Vet J.* 39:129-33.
- Thurmond MC, SK Hietala, PC Blanchard. 1997. Herd based diagnosis on *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J. Vet. Diag. Invest.* 9, 44-49.
- Thurmond MC, Hietala SK. 1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 58, 1381-1385.
- Trees AJ, Williams DJL. 2005. Endogenous and exogenous trans-placental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21, 558-561.

- Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, Williams DJ. 2002. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. *Vet Parasitol.* 109: 147-154.
- Von Blunröder D, Schares G, Norton R, Williams DJJ, Fiestban-Redondo I, Wright S, Björkman C, Frössling J, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Ortega-Mora I. M, Sager H, Hemphill A, Mmanen Van C, Wouda W, Conraths F. J. 2004. Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Veterinary Parasitology* 120: 11-22.
- Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DE, Trees AJ. 2000. *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology*. Oct;121.Pt 4.347-58.
- Williams DJJ, Guy CS, Smith RF, Guy F, McGarry JW, McKay JS, Trees AJ. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 33, 1059-1065.
- Wouda W, C JM Bartels, A R Moen. 1999. Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology* 52, 233-245.
- Wouda W, Moen AR, Visser BJ, Van Knapen F. 1997. Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J Vet Diagn Invest*;9:180-5.
- Wouda W, Brinkhof J, Van Maanen C, de Geer AL, Moen AR. 1998. Serodiagnosis of neosporosis in individual cows and dairy herds, a comparative study of three enzyme-linked immunosorbent assays. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5, 711-716.

V. CONCLUSIONES

1. Ante la incidencia de abortos asociados a *Neospora*, es necesario conocer el estado serológico del rebaño completo pues las explotaciones presentan tasas de infección muy diferentes incluso dentro de una misma zona de estudio.
2. La concordancia de dos técnicas ELISA comerciales: CIVTEST (Hipra, España) y Herdcheck (IDEXX, E.E.U.U) fue muy elevada, lo que indica que ambas técnicas pueden utilizarse indistintamente en el análisis epidemiológico de la infección por *N. caninum* en ganado vacuno lechero.
3. En las explotaciones estudiadas se observó una relación directa entre la seroprevalencia a *Neospora* y la incidencia de abortos. En infecciones crónicas por *N. caninum* previas a la gestación, la parasitación no tiene efecto abortivo en el periodo fetal temprano pero sí tras los 90 días de gestación, ocurriendo el aborto mayoritariamente en el segundo trimestre de la gestación.
4. La vía de transmisión más importante en el mantenimiento de la infección de *N. caninum* en las explotaciones de la zona estudiada fue la vía vertical, o transplacentaria endógena.
5. En animales infectados crónicamente por *Neospora* los factores como la edad (novilla-vaca) y la estación del inicio de la gestación no están relacionados con el aborto.
6. La dinámica de anticuerpos en animales infectados crónicamente a lo largo de la gestación es muy homogénea tanto en animales que abortan como en los que no y supone un aumento de los niveles de anticuerpos a partir del segundo trimestre de gestación.
7. Los anticuerpos frente *N. caninum* en animales crónicamente infectados presentan una elevada estabilidad a lo largo del tiempo, al menos durante tres años consecutivos.
8. Un muestreo serológico anual de rebaños completos es útil para el conocimiento epidemiológico de la infección y la aplicación de medidas de control adecuadas en las explotaciones.
9. En explotaciones con neosporosis crónica los animales que abortan tienen más posibilidades de sufrir nuevamente un aborto, por lo que la eliminación selectiva de estos animales es una medida de control adecuada.



Universitat Autònoma de Barcelona

Biblioteca
de Comunicació
i Hemeroteca General

T VAB/07743

1501057612

