



Neospora caninum: Detección de ADN en sangre durante la primera gestación de vaquillas infectadas naturalmente

Neospora caninum: DNA detection in blood during first gestation of naturally infected heifers

Omar Iván Santana* Carlos Cruz-Vázquez* Leticia Medina-Esparza*
Miguel Ramos Parra* Ciro Castellanos Morales** Daniel Quezada Gallardo**

Abstract

The aim of the study was to detect the DNA presence of *N. caninum* in naturally infected animals, at two moments of their first gestation and at parturition, as well as to record the presentation of abortions. Twenty females between 12 to 14 months of age, seropositive to ELISA test, were selected from a dairy farm with presence of this parasitosis. The females were artificially inseminated and blood samples were taken in the first and second third of gestation and during parturition; DNA was isolated and it was analyzed by a single tube nested PCR with specific primers. In the sampling corresponding to the first third of gestation, 7/20 positive cases were observed (35%), in the second 15/20 (75%) and during parturition 10/20 positive cases (50%). From the total of the animals included in this study, three stayed negative to the test in the three samplings (15%), four were always positive (20%), eight were positive in the second sampling but negative in first (40%) and five were positive in the second and negative in first and the third sampling (25%). All animals remained seropositive during the study; four aborted in the last third of gestation. All the live born calves were seropositive to *N. caninum*.

Key words: *NEOSPORA CANINUM*, DNA, BLOOD, PCR, DAIRY HERD, MEXICO.

Resumen

El objetivo del trabajo fue detectar la presencia de ADN de *N. caninum* en animales infectados naturalmente, en dos tiempos de su primera gestación y al parto, así como registrar la presentación de abortos. Se seleccionó, en un establo, con presencia de parasitosis, un lote de 20 hembras de entre 12 y 14 meses de edad, seropositivas en ELISA, las hembras fueron inseminadas artificialmente y se tomaron muestras de sangre en el primero y segundo tercios de gestación y al parto; se aisló ADN y se sometió a PCR anidado en un solo tubo con iniciadores específicos. En el muestreo correspondiente al primer tercio de la gestación, se observaron 7/20 casos positivos (35%), en el segundo 15/20 (75%) y al parto 10/20 casos positivos (50%). De los animales incluidos en el estudio, tres se mantuvieron negativos a la prueba en los tres muestreos (15%), cuatro fueron siempre positivos (20%), ocho fueron positivos en el segundo muestreo pero negativos en el primero (40%) y cinco fueron positivos en el segundo y negativos en el primero y tercero muestreos (25%). No se presentó seroconversión en ningún animal durante el estudio; cuatro de ellos presentaron aborto en el último tercio de gestación. Todas las crías nacidas vivas resultaron seropositivas a *N. caninum*.

Palabras clave: *NEOSPORA CANINUM*, ADN, SANGRE, PCR, GANADO LECHERO, MÉXICO.

Recibido el 26 de junio de 2009 y aceptado el 12 de abril de 2010.

* Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, Km 18, carretera Aguascalientes-San Luis Potosí, El Llano, Aguascalientes, Apartado Postal 74-2, Apartado Postal 2, C. P. 20041, Aguascalientes, Aguascalientes, México, Tel. (449) 9161251, correo electrónico: cruva18@yahoo.com.mx

** Agropecuaria Tepetatillo, S. A. de C.V., km 30, carretera Aguascalientes-San Luis Potosí, 20330, Aguascalientes, México.

Introduction

Bovine neosporosis is a disease caused by a parasite Apicomplexa, *Neospora caninum*, that can cause abortions between the third and ninth month of gestation, although this occurs more frequently during the fifth and sixth month; it affects mainly dairy cattle and is considered to be an important cause of abortions in Europe, South Africa, Japan, Australia, New Zealand and different countries of America, including Mexico.¹⁻⁵

Parasitosis transmission is carried out by two ways: vertical transmission (endogenous), from an infected mother to its fetus; and horizontal transmission (exogenous), where the bovine must ingest feed or water contaminated with sporulated oocysts of the parasite, that are excreted by dogs the main end carriers of *N. caninum*.

Vertical transmission is recognized as the element responsible for infection perpetuation in the herd.^{4,7} In chronically infected cows, transmission to the fetus during gestation happens as a consequence of latent infection exacerbation due to immunodepression generated by gestation;⁸⁻¹⁰ in consequence parasitemia allows the infecting parasite forms to invade the placenta and other fetal tissues. In these cases, the newborn is clinically healthy although infected, and sometimes there are abortions.^{4,11-13}

Bovine neosporosis diagnosis may be carried out in cattle by different indirect serological techniques such as enzyme linked Immunosorbent assay (ELISA) and indirect immunofluorescence, while in the aborted fetuses direct detection methods are used, such as histopathology, immunohistochemistry and recently PCR assay, using mainly brain, heart and liver that are the most commonly affected organs;^{7,14} also, it has been reported that by PCR it is possible to detect DNA from the parasite in leucocytes, lymphocytes and blood, which directly demonstrates the presence of the parasite in live animals with natural or experimental infections.¹⁵⁻¹⁸

The objective of this study was the detection of *N. caninum* DNA by single tube nested PCR in naturally infected animals at two moments of their first gestation and at parturition, as well as to record the presentation of abortions.

This study was carried out on a dairy farm located in Aguascalientes, Mexico, in the northern central region of Mexico; the farm maintains Holstein cattle lodged in open pens and managed with freedom of movement,¹⁹ feed consists of a ration that includes maize silage, alfalfa, grain mix and mineral complements; this farm had already been detected as seropositive with abortions associated with *N. caninum*.^{3,20}

A lot was selected of 20 heifers, 12 to 14 months

Introducción

La neosporosis bovina constituye una enfermedad causada por un parásito Apicomplexa, *Neospora caninum*, que puede provocar abortos entre el tercero y noveno meses de gestación, aunque es más común que suceda entre el quinto y sexto meses; afecta principalmente al ganado lechero y se considera importante causa de aborto en Europa, Sudáfrica, Japón, Australia, Nueva Zelanda y diferentes países de América, incluyendo México.¹⁻⁵

La transmisión de la parasitosis se realiza mediante dos formas: la transmisión vertical (endógena), de una madre infectada a su feto, y la transmisión horizontal (exógena), en la cual el bovino debe ingerir alimento o agua contaminados con ooquistes esporulados del parásito, que excreta el perro, principal portador definitivo de *N. caninum*.

La transmisión vertical se reconoce como responsable de la perpetuación de la infección en el hato.^{4,7} En vacas infectadas de forma crónica, la transmisión al feto durante la gestación sucede como consecuencia del recrudecimiento de la infección latente, debido a la inmunodepresión generada por la gestación;⁸⁻¹⁰ la parasitemia consecuente permite que las formas infectantes del parásito invadan la placenta y diferentes tejidos fetales. En estos casos, generalmente la cría nace infectada pero clínicamente sana, aunque el aborto también puede presentarse.^{4,11-13}

El diagnóstico de la neosporosis bovina se puede realizar en el ganado mediante diferentes técnicas serológicas indirectas, como el inmunoensayo enzimático (ELISA) y la inmunofluorescencia indirecta, mientras que en los fetos abortados se usan métodos de detección directos, como la histopatología, la inmunohistoquímica y recientemente las pruebas de PCR, utilizando principalmente cerebro, corazón e hígado, que son los órganos comúnmente más afectados;^{7,14} asimismo, se ha informado que mediante PCR es posible detectar ADN del parásito en leucocitos, linfocitos y sangre, lo cual demuestra la presencia del parásito de manera directa en animales vivos con infecciones naturales o experimentales.¹⁵⁻¹⁸

El objetivo del presente trabajo fue detectar la presencia de ADN de *N. caninum* mediante PCR anidado en un solo tubo, en animales naturalmente infectados en dos momentos de su primera gestación y al parto, así como registrar la presentación de abortos.

El estudio se realizó en un establo lechero ubicado en Aguascalientes, México, que se localiza en la región centro-norte de México; el establo mantiene a los animales alojados en corrales abiertos bajo el sistema de estabulación libre con ganado Holstein,¹⁹ y la alimentación consiste en una ración integral que incluye silo de maíz, alfalfa, mezcla de granos y

of age, seropositive to the ELISA test that identifies specific *N. caninum* IgG; detected by commercial Herd Check anti-*N. caninum** with 100% sensitivity and 98.9% specificity, used according to the procedure recommended by the manufacturer. The test was carried out with only one serum dilution (1:100), in order to detect positive and negative animals; the sera were run in pairs and the cutoff point was 0.50, considering as positive those with mean readings of ≥ 0.50 . These animals were artificially inseminated after they were selected for this study.

Two blood samples were taken from the caudal vein with vacuum container tubes,** one without anticoagulant another with EDTA, on three occasions: during the first third of gestation (when it was confirmed by rectal palpation and ultrasound), on the 55th day; on the second third of gestation on day 160th and the last one when either calving or abortion occurred. Calves born from these animals were also included in the study by taking blood samples, without anticoagulant from the jugular vein before they took colostrums.

Blood samples collected without anticoagulant were processed to obtain serum by centrifugation at 1 000 g for 15 min, once obtained it was stored at -20°C until their use. These samples were processed by ELISA, as described above, in order to record optic density values (OD), from each of the three samples of every animal included in the study.

Blood samples, with anticoagulant, were processed to extract DNA using the commercial package Ultraclean DNA BloodSpin,*** following instructions of the manufacturer. DNA samples were subjected to one tube nested PCR, similar to that described by Ellis *et al.*,²¹ using previously established positive and negative controls.³ DNA concentration of each sample was verified by UV spectrophotometer and PCR assays were applied on 5 μ L of the sample with 2 μ g DNA. Amplification products were analyzed in 2.5% agarose gels, running in each gel a molecular weight marker,† to estimate the weight of the amplified product; the gels were stained with ethidium bromide and viewed with an UV light lamp. Positive results were those that showed a product of 146 base pairs.

A chi² test was applied ($P < 0.05$) to compare proportions of positive and negative results to the nested PCR assay in each sampling.

The 20 study animals included in the study maintained their seropositive status during the follow-up period, although they had OD value fluctuations in the different samplings. Nevertheless, the highest OD values in most of the animals corresponded to the second third of gestation (Table 1).

DNA detection in blood was intermittent between animals and between samplings (Table 2); therefore, it

complementos minerales; este establo ya había sido registrado como seropositivo y con abortos asociados a *N. caninum*.^{3,20}

Se seleccionó un lote de 20 vaquillas de entre 12 y 14 meses de edad, seropositivas en la prueba de ELISA que detecta IgG específicas a *N. caninum*; aquella se mediante el uso del paquete comercial Herd Check anti-*N. caninum** con sensibilidad de 100% y especificidad de 98.9%, de acuerdo con el fabricante, siguiendo el procedimiento recomendado por este último. La prueba se trabajó con una sola dilución de suero (1:100), para detectar positivos y negativos; los sueros se corrieron pareados y el punto de corte fue de 0.50, considerándose como positivos los que tuvieran lecturas medias ≥ 0.50 . Estos animales fueron inseminados artificialmente en fechas posteriores a su selección para el presente estudio.

Se tomaron dos muestras de sangre de la vena caudal con tubos de ensaye al vacío,** una sin anticoagulante y otra con EDTA, en tres ocasiones: en el primer tercio de gestación (al confirmarse mediante palpación rectal y ultrasonido), al día 55 de ésta; en el segundo tercio de la gestación, el día 160, y por último al suceder el parto o la presentación del aborto. Las crías nacidas de estos animales también se incluyeron en el estudio, tomando una muestra de sangre, sin anticoagulante, de la vena yugular antes de que tomaran calostro.

Las muestras de sangre recolectadas sin anticoagulante, se procesaron para obtener el suero mediante centrifugación a 1 000 g durante 15 min, el cual se recuperó y almacenó a -20°C hasta su uso. Estas muestras fueron procesadas mediante ELISA, como se describió anteriormente, con la finalidad de registrar el valor de las densidades ópticas (DO), presentes en los tres muestreos para cada animal incluido en el estudio.

Las muestras de sangre, con anticoagulante, se procesaron para extraer ADN utilizando el paquete comercial Ultraclean DNA BloodSpin,*** siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN se sometieron a una PCR anidada en un solo tubo, similar a la descrita por Ellis *et al.*,²¹ utilizando testigos positivos y negativos previamente definidos.³ La concentración de ADN en cada muestra fue verificada por espectrómetro UV y en los ensayos de PCR se usaron 5 μ L de la muestra con 2 μ g de ADN. Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2.5%, corriendo en cada gel un marcador de peso molecular,† para estimar el peso

*IDDEX Laboratories, Inc., Westbrook, Maine, Estados Unidos de América.

**Venoject, Terumo Europe N.V, Bélgica.

***MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, California, Estados Unidos de América

†Phix 174 DNA Promega Co., Madison, Wisconsin, Estados Unidos de América.

was possible to establish that in the respective sampling of the first third of gestation there were 35% (7/20) positive cases; in the second sampling, 75% (15/20) positive cases, and in the sampling carried out during calving, 50% (10/20) positive cases: differences were detected ($P < 0.05$) between samplings. Of the 20 animals included in this study three remained negative to the nested PCR test during the three samplings (15%), four were always positive (20%), eight were positive during the second sampling but negative in the first one (40%) and five were positive in the second and negative in the first and third samplings (25%).

Abortion occurred only in four animals, and in all the cases it happened during the last third of gestation; DNA was detected in the three samplings of two of these cows and in one more during the second third of gestation and at the time of calving (Table 2); it was not possible to have blood serum samples from the aborted fetuses in order to determine presence of anti-*N. caninum* antibodies. All born calves were seropositive.

Results observed in the lot under study allow to infer the presence of *N. caninum* infecting forms circulating

del producto amplificado; los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en una lámpara de luz UV. Se consideró como resultado positivo aquel que mostrara un producto de 146 pares de bases.

Se aplicó una prueba de Ji cuadrada ($P < 0.05$) para comparar las proporciones de positivos y negativos a la prueba de PCR anidado en cada muestreo.

Los 20 animales incluidos en el estudio se mantuvieron como seropositivos durante el periodo de seguimiento, aunque presentaron fluctuaciones en los valores de DO en los diferentes muestreos; sin embargo, el correspondiente al segundo tercio de la gestación presentó los valores de DO más elevados en la mayoría de los animales (Cuadro 1).

La detección de ADN en sangre fue intermitente entre los animales y entre los muestreos (Cuadro 2), por lo que fue posible determinar que en el muestreo correspondiente al primer tercio de la gestación se observara 35% (7/20) de casos positivos; en el segundo muestreo, se observó 75% de casos positivos (15/20), y en el muestreo realizado al momento del parto, 50% (10/20) de casos positivos; se detectaron diferencias ($P < 0.05$) entre los muestreos. De los 20 animales

Cuadro 1
VALORES DE DENSIDAD ÓPTICA (DO), DETECTADOS EN 20 VAQUILLAS BAJO ESTUDIO
MEDIANTE LA PRUEBA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPOS *anti-N. caninum*
OPTIC DENSITY VALUES (OD), DETECTED IN 20 HEIFERS UNDER STUDY BY
ELISA TEST FOR *anti-N. caninum* ANTIBODY DIAGNOSIS

Heifer	Empty	Physiological status		
		1 st Third gestation	2 nd Third gestation	Calving
1	1.541	1.821	2.210	1.949
2	1.087	1.183	2.108	1.923 * aborted
3	1.279	1.030	2.416	1.497
4	0.911	0.679	0.687	0.767
5	1.311	1.375	2.120	2.063
6	1.044	0.724	1.258	0.925
7	1.713	1.397	1.354	1.809
8	1.477	1.475	1.984	2.092 * aborted
9	1.382	1.180	1.778	1.644
10	1.022	0.834	1.869	1.564
11	1.853	1.934	2.368	2.200
12	1.778	1.758	2.295	1.912
13	1.729	1.707	1.988	1.823 * aborted
14	1.665	1.685	0.908	1.353
15	1.180	0.546	0.578	1.805 * aborted
16	1.667	1.643	2.115	1.701
17	1.875	1.313	1.539	1.388
18	0.984	1.085	1.949	1.089
19	0.958	1.597	2.161	2.301
20	1.046	0.823	2.018	2.143

Cuadro 2
DETECCIÓN DE ADN DE *N. caninum* EN SANGRE, MEDIANTE PCR ANIDADA,
EN 20 VAQUILLAS SEROPOSITIVAS INFECTADAS NATURALMENTE
DETECTION OF *N. caninum* IN BLOOD BY NESTED PCR, IN 20
NATURALLY INFECTED SEROPOSITIVE HEIFERS

Cow	Physiological status		
	1 st Third gestation	2 nd Third gestation	Calving / abortion
1	-	-	+
2	+	+	++
3	-	-	-
4	-	+	-
5	-	+	+
6	+	+	+
7	-	-	-
8	-	-	++
9	-	+	+
10	-	+	-
11	-	-	+
12	-	+	+
13	+	+	++
14	+	+	-
15	+	+	-*
16	+	+	-
17	+	+	+
18	-	+	-
19	-	+	-
20	-	-	-

* aborted

in the body of the animals, which indicates that reactivation of infection during gestation of animals with chronic infection has a dynamic presentation beginning from the first third of gestation although not in a continuous manner. Other authors^{15,16} observed a similar situation in two year old animals. Previously, this phenomenon was only evident in live animals by the elevation of antibody titers which was detected mainly during the second third of gestation,^{4,5} that in turn is related to the increase in parasite multiplication, as indicated by the vertical transmission as well as the probability of abortion.²²

Several studies have reported that abortions by *N. caninum* are more frequent between the fifth and sixth months of gestation, that is to say, during the second third of gestation when cell mediated immunity is lowered, and apparently infection reactivation is favored.^{4,8-10} In this study, during sampling made in this period, parasite DNA was detected in 75% of the animals; likewise, in this period the highest OD values of the study were detected in most of the animals. There are literature reports that indicate more frequency of abortions during the second third of gestation than in

incluidos en el estudio, tres se mantuvieron negativos a la prueba de PCR anidado en los tres muestreos (15%), cuatro fueron siempre positivos (20%), ocho fueron positivos en el segundo muestreo pero negativos en el primero (40%) y cinco fueron positivos en el segundo y negativos en el primero y tercero muestreos (25%).

El aborto se presentó únicamente en cuatro animales, en todos los casos sucedió en el último tercio de la gestación; en dos de estas vacas se detectó ADN en los tres muestreos y en una más en el segundo tercio de la gestación y al momento del parto (Cuadro 2); no fue posible contar con muestras de suero sanguíneo de los fetos abortados para determinar la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum*. Todas las crías nacidas vivas fueron seropositivas.

Los resultados observados en el lote bajo estudio permiten inferir presencia de formas infectantes de *N. caninum* circulando por el cuerpo de los animales, lo cual indica que el fenómeno de reactivación de la infección durante la gestación en animales crónicamente infectados se presenta de forma dinámica desde el primer tercio de gestación, aunque no de forma continua; otros autores^{15,16}

the other stages,^{5,23} while there is a study that reports that during this stage it is possible to find in blood 0.155 ng of ADN per each 1 ng of bovine genome, this represents twice the amount found during early gestation stage.¹⁶

On the other hand, high OD values are associated with a higher parasitemia, and are the consequence of higher antibody production, that can help protect animals from abortion,^{9,24} since healthy animals do not produce specific antibodies.¹⁷ In this study, the four animals that aborted did so during the last third of gestation and only one of them was negative to the presence of DNA at the time of abortion, even though OD values were high; abortion by *N. caninum* may happen from the third month of gestation on,^{4,5} and observations have established that it is possible to detect the presence of DNA in blood at the time of abortion.^{15,16} Endemic status of infection by *N. caninum* derives in a low proportion of abortions, but these may be caused by factors associated with the idiosyncrasy of each animal.^{4,5,24}

Literature reports that in herds with endogenous chronic infection, immune response is sufficient to prevent abortion but not vertical transmission,²⁴ this coincides with the results obtained during this study, since all progeny was seropositive; younger animals easily transmit the parasite; therefore, transmission is practically 100% effective.^{6,16}

In conclusion, this study detected the presence of *N. caninum* DNA in circulating blood, at different gestation stages of naturally and chronically heifers which demonstrated that the infection reactivation phenomenon may be present since the first stage of gestation as a mechanism used by the parasite to cause fetus infection and finally cause abortions.

Acknowledgments

Special thanks to the Direccion General de Educacion Superior Tecnologica of the Secretaria de Educacion Publica for financing granted to carry out this study.

Referencias

1. MORALES E, TRIGO FJ, IBARRA F, PUENTE E, SANTACRUZ M. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. J Comp Pathol 2001;125:58-63.
2. GARCIA-VAZQUEZ Z, ROSARIO-CRUZ R, RAMOS-ARAGON A, CRUZ-VAZQUEZ C, MAPES SG. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. Vet Parasitol 2005;134:61-65.
3. MEDINA EL, CRUZ-VAZQUEZ C, QUEZADA TT, MORALES SE, GARCIA VZ. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from

observaron una situación similar en animales de dos años de edad. Anteriormente este fenómeno sólo era evidente en animales vivos por la elevación en el título de anticuerpos, situación que se presenta particularmente en el segundo tercio de la gestación,^{4,5} y que se relaciona con aumento en la multiplicación del parásito, y como indicio de la transmisión vertical, así como de la probabilidad de aborto.²²

Diversos estudios informan que los abortos por *N. caninum* suceden con mayor frecuencia entre el quinto y sexto meses de gestación; es decir, en el segundo tercio de ésta, periodo durante el cual se ha observado detrimento de la inmunidad mediada por células, lo cual parece favorecer la reactivación de la infección.^{4,8-10} En el presente estudio, en el muestreo correspondiente a ese periodo, se detectó ADN del parásito en 75% de los animales; de igual forma, en este periodo se detectaron los valores de DO más altos del estudio en la mayoría de los animales; en la literatura se reconoce que la probabilidad de abortar en el segundo tercio de la gestación es mayor que en otras etapas,^{5,23} mientras que en otro estudio se informa que en dicha etapa es posible encontrar 0.155 ng de ADN del parásito en sangre por cada 1 ng de genoma bovino, ello representa dos veces más que el encontrado en la etapa temprana de gestación.¹⁶

Por otra parte, los valores de DO altos se asocian con mayor parasitemia, y son consecuencia de mayor producción de anticuerpos, los cuales pueden ayudar a proteger del aborto,^{9,24} ya que animales sanos no producen anticuerpos específicos.¹⁷ En el presente estudio, los cuatro animales que presentaron aborto lo hicieron en el último tercio de la gestación y sólo uno de ellos fue negativo a la presencia de ADN al momento de presentarse el aborto, aunque sus valores de DO fueron elevados; el aborto por *N. caninum* puede presentarse a partir de los tres meses de gestación,^{4,5} y se ha observado que alrededor del momento en que ocurre el aborto es posible detectar ADN en sangre.^{15,16} El estado endémico de la infección por *N. caninum* conlleva a la presentación de baja proporción de abortos, pero éstos se pueden desencadenar por factores asociados con la idiosincrasia de cada animal.^{4,5,24}

En la literatura se informa que en hatos con infección crónica endógena, la respuesta inmune es suficiente para prevenir el aborto mas no la transmisión vertical,²⁴ lo que coincide con los resultados del presente estudio, ya que toda la progenie fue seropositiva; los animales con menor edad transmiten más fácilmente el parásito, por lo que la transmisión es prácticamente 100% efectiva.^{6,16}

En conclusión, el presente estudio permitió detectar la presencia de ADN de *N. caninum* en circulación sanguínea en diferentes momentos de la

- dairy herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol* 2006;136:187-191.
4. DUBEY JP, BUXTON D, WOUDA W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol* 2006;134:267-289.
 5. DUBEY JP, SCHARES G, ORTEGA-MORA LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:323-367.
 6. DIJKSTRA TH, BARKEM HW, BJÖRKMAN C, WOUDA W. A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. *Int J Parasitol* 2002;109:203-211.
 7. ORTEGA-MORA L, FERNANDEZ GA, GOMEZ BM. Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. *Acta Parasitol* 2006;51:1-14.
 8. INNES EA, WRIGHT SE, MALEY S, RAE A, SCHOK A, KIRVAR E *et al*. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 2001;31:1523-1538.
 9. INNES EA, ANDRIANARIVO AG, BJÖRKMAN C, WILLIAMS DJL, CONRAD PA. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol* 2002;18:497-504.
 10. INNES EA, WRIGHT S, BARTLEY P, MALEY S, MACALDOWIE C, ESTEBAN-REDONDO I *et al*. The host parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2005;108:29-36.
 11. PARE J, THURMOND MC, HIETALA SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calf hood mortality. *Can J Vet Res* 1996;60:133-139.
 12. DAVINSON HC, OTTER A, TREES AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol* 1999;29:1683-1689.
 13. ROMERO JJ, PEREZ E, DOLZ G, FRANKENA K. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialized Costa Rican dairy herds. *Prev Vet Med* 2002;53:263-272.
 14. DUBEY JP, SCHARES G. Diagnosis of bovine neosporosis. *Vet Parasitol* 2006;140:1-34.
 15. OKEOMA CM, WILLIAMSON NB, POMROY WE, STOWELL KM, GILLESPIE L. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. *Vet Parasitol* 2004;122:307-315.
 16. OKEOMA CM, STOWELL KM, WILLIAMSON NB, POMROY WE. *Neospora caninum*: quantification of DNA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Vet Parasitol* 2005;110:48-55.
 17. SERRANO E, FERRE I, OSORO K, ADURIZ G, MATEOS-SANZ A, MARTINEZ A *et al*. Intrauterine

gestación en vaquillas infectadas naturalmente de forma crónica, lo que demostró que el fenómeno de reactivación de la infección se puede presentar desde el primer tercio de la gestación como un mecanismo utilizado por el parásito para realizar la infección del feto y, finalmente, provocar abortos.

Agradecimientos

Se agradece a la Dirección General de Educación Superior Tecnológica, de la Secretaría de Educación Pública, por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Neospora caninum inoculation of heifers. *Vet Parasitol* 2006;135:197-203.

18. SERRANO-MARTÍNEZ E, FERRE I, MARTÍNEZ A, OSORO K, MATEOS-SANZ A, DEL POZO I *et al*. Experimental neosporosis in bulls: Parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology* 2007;67:1175-1184.
19. CRUZ-VAZQUEZ C, RAMOS PM, VITELA MI, GARCIA-VAZQUEZ Z, QUINTERO-MARTINEZ MT. Relationships between stable fly infestation with some physical facility characteristics and sanitation practices in several dairy farms in the state of Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol* 2007;149:246-250.
20. GARCIA-VAZQUEZ Z, CRUZ-VAZQUEZ C, MEDINA EL, GARCIA TD, CHAVARRIA MB. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol* 2002;106:115-120.
21. ELLIS JT, MCMILLAN D, RYCE C, PAYNE S, ATKINSON R, HARPER PAW. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *Int J Parasitol* 1999;29:1589-1596.
22. PEREIRA-BUENO J, QUINTANILLA-GOZALO A, SEIJAS-CARBALLEDO A, COSTAS E, ORTEGA-MORA LM. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations. *Int J Parasitol* 2000;30:906-909.
23. LOPEZ-GATIUS F, PABON M, ALMERIA S. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 2004;62:606-613.
24. WILLIAMS DJ, TREES AJ. Protecting babies: vaccine strategies to prevent foetopathy in *Neospora caninum*-infected cattle. *Parasite Immunol* 2006;28:61-67.