

**S. Almería de la Merced, F. López-Gatius**

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA NEOSPOROSIS BOVINA  
EN EL NORDESTE ESPAÑOL. UNA PERSPECTIVA CLÍNICA**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **105** N.º 4 (296-312), 2009

## Aspectos epidemiológicos de la neosporosis bovina en el Nordeste español. Una perspectiva clínica

S. Almería de la Merced<sup>\*,\*\*</sup>,<sup>1</sup>, F. López-Gatius<sup>\*\*\*</sup>

\* Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

\*\* Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

\*\*\* Departamento de Producción Animal, Universidad de Lleida, E.T.S.E.A., Avda. Rovira Roure 177, 25198 Lleida, España

### Resumen

El parásito protozoo intracelular *Neospora caninum* ha sido descrito en un amplio rango de especies animales y se considera una de las causas más importantes de aborto en ganado vacuno en todo el mundo. En España, la seroprevalencia individual en las explotaciones y la tasa de infección en fetos abortados es elevada. Revisamos aquí aspectos epidemiológicos de la neosporosis en explotaciones de ganado vacuno lechero de alta producción en el Nordeste español. Es interesante resaltar que independientemente de la seroprevalencia de *N. caninum* a nivel de explotación, la titulación de los anticuerpos frente el parásito es un buen indicador del riesgo de aborto, que la seropositividad frente *N. caninum* es muy estable a lo largo del tiempo, de manera que las vacas crónicamente infectadas presentan un alta tasa de abortos repetitivos, y que la infección por *N. caninum* no afecta a la fertilidad de las vacas infectadas ni compromete la gestación durante el primer trimestre de la misma. El uso de semen de vacuno de carne en la inseminación artificial de vacas seropositivas, especialmente el semen de la raza Limusín, reduce drásticamente la incidencia de abortos. En las explotaciones en las que esta estrategia ha sido incluida como medida de control de la neosporosis, las tasas de aborto se redujeron de manera significativa y, dado que no se mantienen las hijas de madres infectadas, también se redujeron de manera importante las tasas de prevalencia de la enfermedad.

**Palabras clave:** *Neospora caninum*, epidemiología, vacuno lechero, Nordeste España, revisión.

### Summary

#### Epidemiological aspects of bovine neosporosis in north east Spain. A clinical perspective

*Neospora caninum* has been found to infect a wide range of animals and it has emerged as a very important cause of abortion in cattle worldwide. In Spain, high herd seroprevalence and high percentages of infected aborted fetuses have been observed. We revise here several epidemiological aspects of neosporosis based on our studies in high producing dairy herds in North-eastern Spain. Our results indicated a close relationship between mother seropositivity to *N. caninum* and abortion risk and that irrespective of the herd level of *Neospora*-seroprevalence, plasma antibody titration against *N. caninum* is a good indicator of risk of abortion; *Neospora*-infection does not affect fertility nor compromises the subsequent maintenance of gestation during the first trimester of gestation in ani-

---

1. E-mail: sonia.almeria@uab.cat. Tel: 93 581 2847, Fax: 93 581 2006

mals chronically infected prior to pregnancy; *Neospora*-seropositivity can be very stable throughout years so that chronically infected cows can show a high rate of repeat abortions; and that the use of beef semen, especially that derived from the Limousin bulls, reduces dramatically the incidence of abortions. The later approach has been included in the control measures for neosporosis in dairy herds with high prevalence of *N. caninum* and significantly reduced both abortion and seroprevalence levels in those herds.

**Key words:** *Neospora caninum*, epidemiology, dairy cattle, North-East Spain, review.

## Introducción

La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por *Neospora caninum*, protozoo intracelular obligado, formador de quistes tisulares. Descrita por primera vez en perros en 1984 (Bjerkås *et al.*, 1984), *N. caninum* ha sido identificado en una amplia variedad de animales de sangre caliente (ver revisión de Dubey *et al.*, 2007), pero primariamente es una enfermedad del ganado vacuno y del perro. Aunque es un parásito estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii*, no hay evidencia de que infecte a la especie humana (Dubey *et al.*, 2007). En ganado vacuno, tanto de leche como de carne, la neosporosis causa mortalidad neonatal y abortos siendo considerada en la actualidad como una de las principales causas de aborto en ganado vacuno de todo el mundo (Dubey *et al.*, 2007). El aborto es el principal síntoma clínico asociado a la neosporosis bovina, aunque también han sido descritos otros cuadros como alteraciones neuromusculares, incapacidad para levantarse y menor peso de los terneros al nacimiento (Dubey *et al.*, 2006). La infección por *N. caninum* también se ha asociado a tasas de reposición más elevadas, por tanto con un menor valor económico de las vacas desde un punto de vista reproductivo, y a la lógica reducción en la producción de leche en las explotaciones debida a los abortos (revisado Trees *et al.*, 1999).

En ganado vacuno la infección por *N. caninum* ha sido descrita a nivel mundial. En

España, tras la descripción de los primeros casos de aborto en ganado vacuno (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 (Quintanilla *et al.*, 1999; Mainar-Jaime *et al.*, 1999). En concreto, en un estudio reciente europeo, la seroprevalencia de la infección por *N. caninum* en vacuno en España fue la más elevada, en comparación con Alemania, Holanda o Suecia, con prevalencias en nuestro país del 63% en vacuno lechero y del 46% en vacuno de carne (Bartels *et al.*, 2006). Igualmente, la prevalencia de infección observada en fetos abortados es muy elevada, con unas cifras desde el 32% al 57% de los fetos infectados, dependiendo de los criterios de diagnóstico (González *et al.*, 1999; Mainar-Jaime *et al.*, 1999; Pereira-Bueno *et al.*, 2003).

En el presente trabajo, resultado de una serie de estudios realizados por nuestro equipo, se revisan los aspectos epidemiológicos y las implicaciones clínicas de la neosporosis bovina en explotaciones de ganado lechero de alta producción del Nordeste de España.

## Ciclo y formas de transmisión

El ciclo de *N. caninum* es indirecto y existen tres estadios infectantes: taquizoitos, bradizoitos y ooquistes. Los dos primeros, taqui-

zoitos y bradizoitos, están en el interior de quistes y son los estadios intracelulares que aparecen en los hospedadores intermedios (HI), mientras que los ooquistes son los estadios excretados por los hospedadores definitivos (HD) que para ser infectantes deben esporular en el medio ambiente.

En los HI ocurre la fase asexual de multiplicación del parásito. Los **taquizoitos** se multiplican a gran velocidad en diversos órganos del hospedador durante la fase aguda de la infección. Son la fase más patógena, causan lisis celular por división activa en las células que los hospedan y son los responsables de la transmisión transplacentaria al feto en las hembras gestantes. Posteriormente, los taquizoitos se transforman en **bradizoitos**, que se multiplican de manera lenta en el interior de quistes y se asocian con la fase crónica de la infección (Dubey et al., 2007). Estos quistes se localizan principalmente en el sistema nervioso central, pero se han descrito también en el tejido muscular estriado (Peters et al., 2001). Tras el consumo por HD de quistes tisulares de HI, por ejemplo con la ingestión de una placenta o de un feto abortado de una vaca infectada, ocurre la fase sexual del parásito en los HD, con formación de **ooquistes** que se excretan por las heces y esporulan en el medio ambiente en unas 24 horas. Estos ooquistes son de muy pequeño tamaño (10-11 mm de diámetro) y pueden contaminar agua y alimentos constituyendo la fase infectante para los HI. Entre los HD confirmados se encuentra el perro (McAllister et al., 1998) y el coyote (Gondim et al., 2004a) y recientemente se han observado ooquistes en zorros (Wapenaar et al., 2006). Se sospecha que otros cánidos silvestres como los lobos puedan actuar también como HD (Gondim et al., 2004a).

En el ganado vacuno existen dos formas de transmisión: horizontal y vertical. La **transmisión horizontal** de la infección, **tam-**

**bién denominada trasplacentaria exógena**, es posible por la ingestión de ooquistes eliminados en las heces del HD, tras su esporulación en el medio ambiente, que contaminan el alimento (pastos y forrajes y alimentos almacenados) y el agua de bebida. Sin embargo, la principal vía de transmisión de la infección en las explotaciones es la **transmisión vertical, congénita, materno-fetal, o trasplacentaria endógena**. En los animales infectados de forma congénita, que nacen aparentemente sanos, se detectan anticuerpos frente a *Neospora* antes de la toma del calostro (Dubey et al., 2007).

*Neospora caninum* es uno de los organismos con mayor capacidad de transmisión vertical en el ganado vacuno. Hasta un 95% de los terneros pueden nacer infectados verticalmente en una misma explotación y el parásito puede pasar de la madre al feto durante varias generaciones (Revisado Dubey et al., 2007). La mayoría de los terneros nacidos de madres seropositivas, son clínicamente normales, pero 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 las explotaciones. Por otro lado, los abortos y la infección en general pueden repetirse en un mismo animal.

La transmisión lactogénica, aunque se considera posible pues experimentalmente se ha logrado infectar terneros recién nacidos y se ha detectado DNA en leche y calostro (Moskwa et al., 2003 y 2007), no parece posible en condiciones naturales (Dijkstra et al., 2001). La transmisión por vía venérea es poco probable aunque se ha detectado DNA de *Neospora* en semen de toros (Ferre et al., 2005). A fecha de hoy no se ha demostrado la transmisión directa de vaca a vaca.

### Posibilidad de ciclos silváticos de *N. caninum* en España

Muchos aspectos del ciclo de *N. caninum* son todavía desconocidos (Dubey *et al.*, 2006). En Norteamérica se ha confirmado la transmisión de *N. caninum* entre ciervos de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) y cánidos en un ciclo silvático (Gondim *et al.*, 2004b). Estos autores han demostrado que perros alimentados con cerebros de ciervos de cola blanca infectados de manera natural, eliminan ooquistes y por tanto son capaces de cerrar el ciclo, verificando la existencia de ciclos silváticos. La existencia de un ciclo similar en Europa no ha sido descrita hasta la fecha.

Estudios realizados en diferentes áreas de España han puesto de manifiesto la presencia de anticuerpos en ciervos (*Cervus elaphus*), arruís (*Ammotragus lervia*), corzos (*Capreolus capreolus*) y en jabalíes (*Sus scrofa*), aunque en éstos de manera ocasional (Almería *et al.*, 2007). En carnívoros silvestres se han detectado anticuerpos en zorros (*Vulpes vulpes*), lobos (*Canis lupus*), lince ibérico (*Lynx pardinus*), gatos silvestres (*Felis silvestris*) y diferentes especies de mustélidos (*Meles meles*, *Martes foina*, *Martes martes* y *Mustela putorius*) (Sobrinó *et al.*, 2008), demostrando el contacto con el parásito en estas especies de la fauna silvestre en nuestro país.

Entre los rumiantes silvestres las prevalencias más elevadas de anticuerpos frente *N. caninum* fueron observadas en los ciervos (Almería *et al.*, 2007). Dada la abundancia de zorros, éstos podrían tener un papel relevante en la epidemiología de la neosporosis y de hecho han sido considerados un factor de riesgo para el ganado vacuno (Simpson *et al.*, 1997; Barling *et al.*, 2000). En Europa, la presencia de DNA de *N. caninum* ha sido demostrada en cerebro de zorros en Cataluña (Almería *et al.*, 2002) y en la República Checa (Hurková and Modrý, 2006). Los resultados observados tanto en rumiantes como

en carnívoros silvestres indican que la infección de *N. caninum* en España parece estar bastante localizada en ciertas zonas donde, sin embargo, puede alcanzar prevalencias moderadas a altas (Almería *et al.*, 2007; Sobrinó *et al.*, 2008). En concreto, en un reciente estudio en zorros en una zona de los Pirineos Catalanes se encontró una seroprevalencia muy elevada (Marco *et al.*, 2008). La incorporación de las especies silvestres en la epidemiología de la neosporosis complica el enfoque de control aislado en las explotaciones vacunas, poniendo de manifiesto la necesidad de tomar medidas de control que involucren a la fauna silvestre (Almería *et al.*, 2007).

### Relación de la seropositividad frente *N. caninum* con el aborto y principales vías de transmisión del parásito en explotaciones de ganado vacuno lechero del Nordeste de España

Analizando todos los animales de una explotación, exceptuando los animales menores de 6 meses para evitar los anticuerpos debidos a la ingestión de anticuerpos calostrales procedentes de madres seropositivas, se evaluó la prevalencia de animales seropositivos y su relación con cuadros de aborto y las vías de transmisión fundamentales en explotaciones de alta producción lechera en Cataluña. La toma de muestras en las explotaciones se hizo coincidiendo con el muestreo anual para el control de brucelosis y otras enfermedades.

En un primer estudio retrospectivo llevado a cabo durante 12 meses en una explotación en la que la tasa de aborto alcanzó un 23,2% (38 abortos de 164 gestaciones diagnosticadas), se encontraron anticuerpos frente *N. caninum* en un 35,4% de las vacas (84 vacas seropositivas de 237) y el 44% de los animales seropositivos abortaron durante el periodo de 1 año (López-Gatius *et al.*,

2004a). La presencia de anticuerpos frente *N. caninum* fue la única variable incluida en el modelo de regresión logística en relación con el aborto. La infección por *N. caninum* aumentó la probabilidad de aborto en las vacas con un riesgo relativo de 12,2 veces ( $P < 0.0001$ ) al de los animales no infectados. Los factores generalmente asociados con las pérdidas de la gestación en la zona (edad de las vacas y estación de la gestación) no tuvieron efecto en este brote de abortos. La principal vía de transmisión en la explotación fue la transmisión vertical, dado que no se encontraron diferencias relacionadas con la edad respecto a la seroprevalencia en el brote de abortos. Basada en la relación del estado serológico entre madres e hijas en la explotación, la infección congénita superó el 90%. En concreto el 90,6% de madres seropositivas tuvieron crías seropositivas y el 90,9% de los terneros de madres seropositivas fueron seropositivos (López-Gatius *et al.*, 2004a). De interés fue el hecho de que dos terneros seropositivos nacieron de vacas seronegativas, indicando un pequeño grado de transmisión horizontal (López-Gatius *et al.*, 2004a). La granja no había tenido perros en los siete años anteriores, pero cabe la posibilidad de que ocurriera algún tipo de contacto con cánidos silvestres.

En un estudio posterior, se compararon dos kits comerciales de ELISA (Herd check<sup>®</sup> anti-*Neospora*, IDDEX Laboratorios, Madrid, España y CIVTEST<sup>®</sup>, HIPRA, Girona, España) en muestras de 6 explotaciones incluyendo un total de unos 3.400 animales mayores de 6 meses. Ambos kits presentaron un nivel de concordancia muy elevado, considerando la seropositividad en CIVTEST  $\geq 6.0$  (valor kappa medio de 0,94, 0,90-0,96) (López-Gatius *et al.*, 2004b). En un reciente estudio a nivel europeo estos dos kits fueron comparados junto a otros y mostraron alta sensibilidad y especificidad (Bartels *et al.*, 2006). En todas las explotaciones se observó una

altísima relación de los animales seropositivos con los cuadros de aborto, confirmados mediante detección de *N. caninum* en los fetos. Al igual que en la explotación del estudio anterior, en estas explotaciones se observó una baja tasa de seroconversión y de transmisión horizontal (López-Gatius *et al.*, 2004b) que aunque baja es importante en el mantenimiento de la infección en las explotaciones, dado que la transmisión vertical no es del 100% (Davison *et al.*, 1999).

#### Temporalidad del aborto durante la gestación

El aborto es el principal síntoma clínico asociado a la neosporosis bovina. Los abortos por *N. caninum* pueden tener lugar desde los tres meses de gestación hasta finales de gestación, aunque la mayoría de los abortos tienen lugar entre los 5-7 meses de gestación (Anderson *et al.*, 1991; Barr *et al.*, 1991; Wouda *et al.*, 1997; Hattel *et al.*, 1998) según hemos observado también en nuestros estudios (López-Gatius *et al.*, 2004a). Sin embargo, los efectos de la infección por el parásito en el primer trimestre, cuando es difícil tener acceso a fetos, no están completamente aclarados. Por ello, analizamos el efecto abortivo de *N. caninum* antes y después de los 90 días de gestación en 2.773 gestaciones, de ellas 419 en animales seropositivos antes de la gestación, procedentes de seis explotaciones (López-Gatius *et al.*, 2004b). Los resultados mostraron que la seropositividad frente *N. caninum* no fue un factor de riesgo para la pérdida de la gestación durante el primer trimestre de la misma, mientras que a partir de los 90 días de gestación fue la única variable involucrada en los abortos, incrementando el riesgo de aborto en 18,9 veces ( $P < 0.0001$ ; 95% intervalo de confianza de 12,9 a 27,8), respecto a las vacas no infectadas. Estos resultados sugieren que en el caso de animales infectados crónicamente

por el parásito previamente a la gestación, la infección por *N. caninum* no se relaciona con los abortos durante el período fetal temprano pero sí tienen un enorme efecto abortivo tras los 90 días de gestación.

#### Abortos recurrentes en vacas infectadas por *N. caninum*

Los brotes de abortos asociados a *N. caninum* pueden ser el resultado de una infección puntual, por ejemplo debida a la ingestión de alimentos contaminados por ooquistes o, más frecuentemente, ocasionados por la reactivación del parásito en vacas crónicamente infectadas, que es lo habitual en nuestra zona. 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 *N. caninum* no se desarrolla tal respuesta protectora o lo hace en menor medida (Williams *et al.*, 2003). Los abortos y la infección en general pueden repetirse en un mismo animal, aunque en una menor proporción (Barr *et al.*, 1993; Anderson *et al.*, 1995). Dado que las vacas seropositivas que abortan tienen una mayor probabilidad de ser eliminadas de la explotación, es difícil evaluar si las vacas crónicamente infectadas mantienen el riesgo de aborto durante sucesivas lactaciones o si se hacen resistentes al parásito. En un estudio retrospectivo en el que se incluyeron datos de vacas seropositivas durante tres años consecutivos en la misma explotación, respecto del total de animales seropositivos el 36,8% de los abortos de la explotación y el 26,7% de los abortos en los animales que permanecieron los tres años en la misma, tuvieron lugar en animales que tenían un historial previo de aborto (Pabón *et al.*, 2007). Por tanto, nuestros resultados confirman que las vacas que han abortado una vez tienen un riesgo de aborto similar al de las vacas que no han abortado nunca y que dichos animales no

desarrollan una respuesta inmune protectora suficiente frente el aborto, de acuerdo con lo resultados de Thurmond y Hietala, (1997) y Corbellini *et al.* (2006). La eliminación de las vacas seropositivas que hayan sufrido dos o más abortos podría por tanto recomendarse para la reducción del aborto asociado a *N. caninum* en las explotaciones.

#### Efecto del estrés climático en vacas de alta producción lechera infectadas crónicamente por *N. caninum*

En dos explotaciones analizadas en nuestra zona de estudio observamos que un factor de riesgo en la presentación de abortos asociados a *N. caninum* fue la lluvia (López-Gatius *et al.*, 2005c). Se hipotetizó que la lluvia en zonas secas como el Nordeste de España, puede ser causa de estrés directo e indirecto a los animales (cambios a temperaturas más frías, cambios de comportamiento, cambios en la calidad de los alimentos, peor higiene...) que pueden desencadenar cuadros de aborto en animales crónicamente infectados con *N. caninum*. En un estudio reciente, igualmente se observó que un incremento en el número de días acumulados con humedad relativa superior al 60% en el segundo trimestre de gestación aumentó el riesgo de aborto tanto en vacas como en novillas y en el caso de las vacas el aumento de lluvia tuvo el mismo efecto (Yaniz *et al.*, en prensa, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x). Los factores climáticos como la lluvia o las altas temperaturas parecen promover la esporulación de los ooquistes de *N. caninum* y su diseminación y por tanto, favorecer la transmisión postnatal. Otra explicación es que esas condiciones climáticas pueden favorecer el crecimiento de hongos y éstos y sus toxinas pueden ser causa de inmunosupresión en la vaca y a su vez favorecer la reactivación de infecciones de *N. caninum* en los animales crónicamente infectados (Dubey *et al.*, 2007).

El análisis serológico anual de las explotaciones puede ser un método efectivo y rápido de detectar animales infectados por *N. caninum* y que permite valorar el riesgo de aborto relacionado con la infección

Como se ha indicado anteriormente, en nuestros estudios se ha observado una relación muy clara entre la seropositividad a *N. caninum* y los cuadros de aborto, confirmada por la detección del parásito en fetos abortados. El riesgo relativo de aborto en las vacas seropositivas fue de entre 12-19 veces superior respecto de las seronegativas en las distintas explotaciones analizadas (López-Gatius *et al.*, 2004a, b). Similares resultados han sido observados en múltiples estudios en todo el mundo (revisado Dubey *et al.*, 2007). De interés es el hecho de que, independientemente del nivel de seroprevalencia alcanzado en cada explotación (seroprevalencias del 3 al 36%), las tasas de aborto registradas en los animales seropositivos fueron similares (30%) (tabla 1) (López-Gatius *et al.*, 2005a).

Por otro lado, cuando se consideraron los títulos y no sólo si los animales eran seropositivos, se observó también una relación significativa entre los títulos de anticuerpos y el aborto (una unidad de incremento en los títulos de anticuerpos a *Neospora* se relacionó con un incremento de 1,01 veces la tasa de aborto ( $P = 0,004$ ) (Lopez Gatius *et al.*, 2005b). Varios estudios han relacionado los cuadros de aborto con los títulos de anticuerpos (Kashiwazaki *et al.*, 2004; Waldner, 2005). En estudios recientes en nuestra zona hemos observado que los abortos son significativamente menos frecuentes en los animales seropositivos que presentan bajos niveles de anticuerpos ( $< 30$  unidades en CIVTEST) comparados con los de altos niveles ( $\geq 30$  unidades CIVTEST) (Yániz *et al.*, en prensa, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x; Almería *et al.*, 2009a). Sin embargo, la titulación de anticuerpos frente a *N. caninum* no se pudo relacionar con una mayor o menor probabilidad de aborto cuando se incluyeron en el estudio los resultados obtenidos en las novillas (López-Gatius *et al.*, 2005c). Igualmente, en un estudio reciente

Tabla 1. Animales seropositivos frente *Neospora caninum* y tasas de aborto en tres explotaciones (A, B y C)<sup>a</sup>

Table 1. *Neospora caninum* seropositive animals and abortion rates in 3 herds (A, B and C)<sup>a</sup>

Explotación	N	Animales Seropositivos (%)	Animales Seropositivos que abortaron (%)	Animales Seronegativos que abortaron (%)
A	180	47 (26) <sup>b</sup>	18/64 (28) <sup>c</sup>	4/182 (2) <sup>d</sup>
B	440	123 (28) <sup>b</sup>	60/192 (31) <sup>c</sup>	21/646 (3) <sup>d</sup>
C	1350	60 (4) <sup>b</sup>	19/58 (33) <sup>c</sup>	68/1398 (5) <sup>d</sup>
Total	1970	230 (12) <sup>b</sup>	97/314 (30) <sup>c</sup>	93/2226 (4) <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Basados en análisis serológicos anuales frente *N. caninum* y en la confirmación de *N. caninum* en los fetos abortados

<sup>b</sup>Respecto al número total de animales

<sup>c</sup>Respecto al total de gestaciones en animales seropositivos

<sup>d</sup>Respecto al total de gestaciones en animales seronegativos

Las tasas de aborto (c versus d) en los tres rebaños fueron significativas ( $P < 0.0001$ ) en test  $X^2$  (López-Gatius *et al.*, 2005a)



(Yániz *et al.*, en prensa, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x) se ha observado una probabilidad de aborto 3,2 veces menor en vacas con bajos niveles de anticuerpos frente *N. caninum* (6 a 29 unidades) comparadas con vacas con tasas elevadas de anticuerpos ( $\geq 30$  unidades), mientras que en las novillas esta variable no presentó ningún efecto. Estos resultados parecen indicar que algunos factores que intervienen en los abortos por *N. caninum* son diferentes en novillas y en vacas probablemente relacionadas con primo-infección *versus* múltiples infecciones en estos animales (Yániz *et al.*, en prensa, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x).

En animales infectados, la presencia de anticuerpos frente *N. caninum* es estable a lo largo del tiempo

En el estudio retrospectivo en el que se incluyeron datos de vacas seropositivas durante tres años consecutivos en la misma explotación, se observó que los anticuerpos frente *N. caninum* permanecieron por encima del umbral de seropositividad a lo largo de esos años en la mayoría de los animales. De una prevalencia inicial del 18% en 122 animales, en el segundo año sólo se observó seroconversión en 4 animales, lo que incrementó la prevalencia al 21,3% que permaneció sin cambios en un tercer año (Pabón *et al.*, 2007). Similarmente, Hasler *et al.* (2006) observaron que sólo 2 de 30 animales seropositivos y 1 de 83 seronegativos cambiaron su estado serológico durante la gestación, indicando que en vacuno infectado crónicamente los anticuerpos presentan una pequeña inestabilidad transitoria. Estos resultados refuerzan la idea de que un análisis serológico anual es un método efectivo para el estudio de la prevalencia e infección por *N. caninum* en las explotaciones. Por todo ello, independientemente de la seroprevalencia frente *N. caninum* a nivel de explotación, la serología materna, incluyendo los títulos, puede ser un buen indi-

cador del aborto (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000; López-Gatius *et al.*, 2005b) y de utilidad en los programas de control reproductivo de las explotaciones.

Dinámica de anticuerpos a lo largo de la gestación en vacas crónicamente infectadas por *N. caninum*

Algunos autores han indicado que los anticuerpos frente *N. caninum* sufren fluctuaciones a lo largo de la gestación (Quintanilla *et al.*, 2000). Cuando se estudió la dinámica de anticuerpos a lo largo de la gestación en 86 vacas crónicamente infectadas por *N. caninum*, procedentes de 2 explotaciones en el Nordeste de España con infección confirmada en fetos, 21 de las cuales abortaron (Nogareda *et al.*, 2007), se observaron dos claros modelos en la dinámica de anticuerpos. Aproximadamente un 50% de los animales presentaron un aumento de anticuerpos en la segunda mitad de la gestación mientras el otro 50% no presentó dicho aumento y en los animales que abortaron también aproximadamente la mitad presentó un pico de anticuerpos alrededor del aborto mientras en otros animales este pico no fue evidente. Fluctuaciones en la seroprevalencia, entendida como aquellos animales con valores seronegativos en algún muestreo a lo largo de la gestación fueron observadas en 2 de las vacas que abortaron y en 11 de las no abortadas. El hecho de que algunos animales presentaran resultados negativos en el momento del aborto o del parto es de importancia diagnóstica, ya que muchas veces se envían los fetos abortados con la sangre materna y ésta puede resultar negativa (Nogareda *et al.*, 2007).

Dado que varias vacas que abortaron presentaron los máximos niveles de anticuerpos antes del aborto con un consistente aumento de anticuerpos a mediados de la gestación, el incremento de la respuesta humoral indicaría una reactivación de la

infección parasitaria más que una reinfección propiamente dicha en estos animales.

La infección por *N. caninum* no afecta la fertilidad de vacas de alta producción lechera

En explotaciones con alta incidencia de abortos asociados a *N. caninum* (30% de las vacas seropositivas) no se encontró un efecto de la infección sobre la fertilidad (López-Gatius *et al.*, 2005a). El porcentaje de vacas gestantes seronegativas (34%: 2.226/6.556) fue semejante al de las seropositivas (33%:314/962). Sí que afectaron factores ampliamente reconocidos como estación, explotación, número de lactación, toro y técnico inseminador. Estos datos indicarían que el aparato genital de la vaca infectada con *N. caninum* parece no quedar dañado de manera que la neosporosis no afecta la fertilidad.

*Neospora caninum* parece no afectar la función placentaria en las vacas infectadas que no abortan

La determinación de la concentración de glicoproteínas asociadas a la gestación (PAG-1) en la sangre materna se ha empleado para el diagnóstico de gestación y como un marcador del bienestar placentario y fetal (Patel *et al.*, 1997; Zarrouk *et al.*, 1999). En un estudio reciente (López-Gatius *et al.*, 2007a), las concentraciones de PAG a lo largo de la gestación no presentaron diferencias en 13 animales crónicamente infectados que no abortaron comparados con 6 controles seronegativos, mientras que en 3 animales seropositivos que abortaron o presentaron fetos momificados los niveles de PAG fueron muy bajos o no detectables. Estos resultados parecen indicar que las concentraciones de PAG-1 son un buen indicador del estado feto-placentario en los animales que sufren aborto asociado a *N. caninum*, mientras que en las vacas con

infecciones crónicas que no abortan la infección parece no afectar la función placentaria. Resultados similares han sido observados en un estudio más amplio en el que se analizaron 89 animales gestantes (Serrano *et al.*, 2009). Las gestaciones gemelares, el uso del semen de Limusín en la inseminación artificial y si las gestaciones tenían lugar en el periodo cálido fueron factores que afectaron las concentraciones de PAG, pero no la seropositividad frente *N. caninum* o los títulos de anticuerpos frente al parásito.

El tratamiento con progesterona a partir del cuarto mes de gestación puede inducir aborto en vacas seropositivas con alta titulación a *N. caninum*

La respuesta inmune promovida por células y citoquinas denominadas Th1 es considerada protectora frente protozoos, incluyendo *N. caninum*. Sin embargo, durante la gestación hay una considerable inmunomodulación endocrina de la respuesta inmune, ya que una excesiva respuesta inmune de tipo celular podría estar relacionada con el aborto en vacas infectadas (revisado por Innes *et al.*, 2005). En la inmunomodulación natural de la gestación, la progesterona se ha relacionado con la reducción de la respuesta inmune celular Th1 (Druckmann y Druckmann, 2005). Por todo ello, se planteó la hipótesis de que la aplicación de un tratamiento con progesterona durante el segundo tercio de la gestación podría reducir la tasa de abortos. Se asignaron animales seropositivos frente *N. caninum* en un grupo Control (n = 33) y en un grupo Tratamiento (n = 34). El tratamiento consistió en la aplicación de un dispositivo intravaginal liberador de progesterona (1,55 g de progesterona) el día 120 de gestación durante 28 días. Se observó que las vacas con alta titulación tenían una probabilidad de aborto 14,3 veces más alta tras el tratamiento que las

que no recibieron tratamiento, mientras que en vacas con baja titulación el tratamiento con progesterona no tuvo efecto (figura 1). Estos resultados no soportaron la hipótesis previa establecida y sugieren que en vacas con alta titulación de anticuerpos frente a *N. caninum* el tratamiento con progesterona incrementa la tasa de abortos, posiblemente debido a una reducción excesiva de la respuesta inmune de tipo celular (Bech-Sàbat *et al.*, 2007).

Efecto protector de la producción de IFN- $\gamma$  en la reducción del riesgo de aborto en vacas crónicamente infectadas por *N. caninum*

Dado que la suplementación con progesterona a mitad de gestación no disminuyó el riesgo de aborto en las explotaciones, una hipótesis complementaria fue que la producción de IFN- $\gamma$  podría tener un papel en el mantenimiento de la gestación durante la infección

por *N. caninum*. Se analizó la producción de esta citoquina Th1, en 86 vacas seropositivas y en 40 seronegativas. Se observó producción en 16 (19%) de las vacas seropositivas pero no en las seronegativas (López-Gatius *et al.*, 2007b). De las 126 gestaciones 22 (17,5%) acabaron en aborto, que tuvo lugar en un 24,4% (21/86) de las vacas seropositivas y en un 2,5% de las seronegativas (1/40). El riesgo relativo de aborto fue 15,6 veces superior en las vacas seropositivas que no produjeron IFN- $\gamma$  comparado con las seronegativas, mientras la neosporosis no tuvo ningún efecto en las seropositivas que produjeron IFN- $\gamma$  (tabla 2). Por otro lado, se observó un efecto negativo ( $P = 0.001$ ) de la producción de IFN- $\gamma$  en el título de anticuerpos frente *N. caninum* en los 65 animales seropositivos que no abortaron. Estos resultados indican que la producción de IFN- $\gamma$  está asociada con la protección frente el aborto causado por *N. caninum* en las vacas crónicamente infecta-

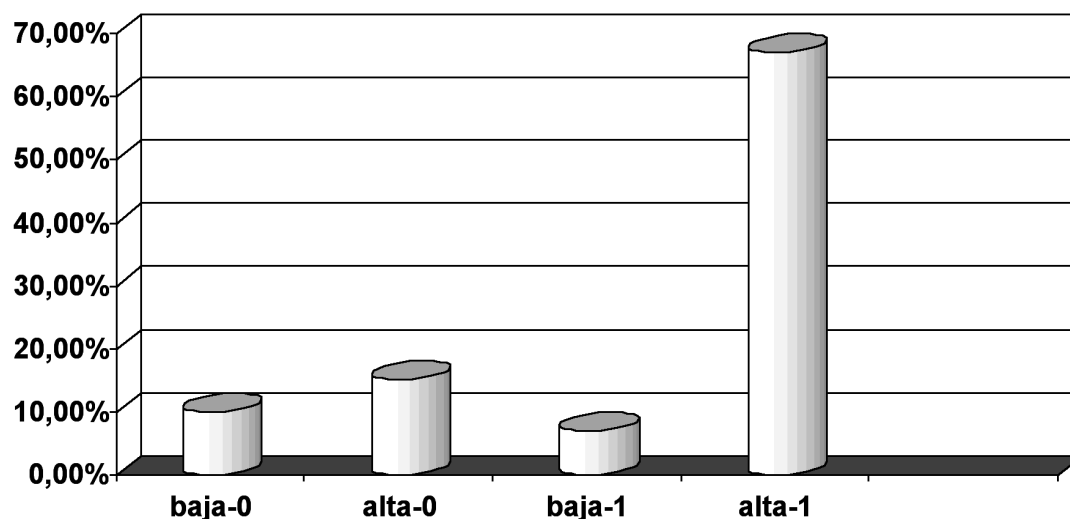


Figura 1. Tasas de aborto en animales con baja (< 30 unidades) o alta titulación ( $\geq 30$  unidades) frente *N. caninum* antes del tratamiento (0-1) con progesterona a mediados de la gestación.  
Figure 1. Abortion rates in animals with low (< 30 relative units) or high titres ( $\geq 30$  relative units) against *N. caninum* before treatment (0-1) with progesterone at mid-gestation

Tabla 2. Efectos de la producción de IFN- $\gamma$  en las tasas de aborto de vacas seropositivas a *Neospora caninum*

Table 2. Effects of IFN- $\gamma$  production on abortion rates of *Neospora caninum* seropositive cows

Producción de IFN- $\gamma$	Seropositividad frente <i>N. caninum</i>	Tasa de aborto n	%	Odds ratio	95%IC <sup>a</sup>	P
Negativas	Seropositivas	20/70	28,6	15,6 <sup>b</sup>	2-121	0,009
Positivas	Seropositivas	1/16	6,3	2,6	0.2-44,6	0,51
Negativas	Seronegativas	1/40	2,5	Referencia		

<sup>a</sup>Intervalo de Confianza

<sup>b</sup>Riesgo relativo de que una vaca seropositiva a *N. caninum* sin producción de IFN- $\gamma$  sufra aborto, comparada con una vaca seronegativa. (López-Gatius *et al.*, 2007b)

das y que las vacas que producen IFN- $\gamma$  en algún momento de la gestación presentan niveles de anticuerpos más reducidos (López-Gatius *et al.*, 2007b).

Cuando se analizaron los isotipos de IgGs presentes (IgG1 e IgG2) en relación con la producción de IFN- $\gamma$  (Almería *et al.*, 2009b), se observó un efecto negativo significativo en la producción de IgG1, mientras la producción de IFN- $\gamma$  no afectó los niveles de IgG2. Por el contrario, se observaron mayores niveles de IgG2 comparado con IgG1 en los animales que abortaron, independientemente de que produjeran o no IFN- $\gamma$ . Estos resultados parecen indicar que los anticuerpos IgG2 pueden ser parte de la respuesta protectora, pero sólo si van asociados a la producción de IFN- $\gamma$ . Por si solos no son suficientes para proteger a las vacas crónicamente infectadas frente al aborto (Almería *et al.*, 2009b).

El efecto de la infección por *Neospora caninum* sobre la producción de leche

En un estudio reciente se registraron niveles plasmáticos de prolactina más altos en vacas seropositivas, en comparación de las seronegativas (García-Ispierto *et al.*, 2009), mientras que en otro estudio se constató que la glán-

dula mamaria tenía un aspecto más saludable y era más resistente a los agentes infecciosos en animales infectados que en los no infectados (Peregrine *et al.*, 2004). Estos resultados sugieren, por una parte, un efecto protector de la prolactina frente a la enfermedad parasitaria, probablemente debido a su acción pro-inflamatoria (Brand *et al.*, 2004), y, por otra, un incremento de la respuesta inmune no específica frente a las infecciones de la glándula mamaria (Peregrine *et al.*, 2004). Por tanto, a pesar de que a nivel de explotación se reduce la producción de leche por el efecto negativo de la neosporosis en el ciclo reproductivo de la vaca (revisado Trees *et al.*, 1999), las vacas infectadas podrían producir más leche que las no infectadas (Pfeiffer *et al.*, 2002; García-Ispierto *et al.*, 2009).

El uso de semen de ganado vacuno de carne, especialmente de la raza Limusín, en la inseminación artificial de vacas crónicamente infectadas con *N. caninum* reduce el riesgo de aborto frente al parásito

Para reducir la prevalencia de infección por *N. caninum* en las explotaciones, especialmente en aquellas con tasas elevadas de seropositividad, dado que no existe tratamiento adecuado, se propuso la inseminación de los anima-

les seropositivos de los que no interesaba dejar descendencia en las explotaciones con semen de vacuno de carne. Cuando se aplicó esta medida de control, fue especialmente interesante el hecho que, además de reducir la prevalencia de infección en las explotaciones, la inseminación con semen de vacuno de carne disminuyó de manera drástica los abortos en las vacas seropositivas inseminadas (López-Gatius *et al.*, 2005b; Pabón *et al.*, 2007). En función del semen de toro utilizado, por ejemplo de las razas Limusín y Blanco Azul Belga, pudimos constatar un riesgo relativo 2,8 veces inferior en vacas seropositivas gestantes de razas cárnicas, cuando lo comparamos con animales gestantes de semen Frisón (Yaniz *et al.*, en prensa, doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x). Un estudio reciente más amplio, basado en un elevado número de animales (1.115 vacas seropositivas a *N. caninum* inseminadas), ha

confirmado estos resultados (Almería *et al.*, en prensa, doi:10.1016/j.vetpar.2009.04.026). En este estudio el aborto tuvo lugar en un 15,2% (96/633) de las vacas seropositivas inseminadas con semen de vacuno de carne, en contraste con un 32,2% (155/482) de aborto en vacas inseminadas con semen de frisón. También se observaron diferencias en el riesgo de aborto con las diferentes razas cárnicas empleadas. Los porcentajes de aborto fueron del 32% de 482 vacas inseminadas con semen frisón, 22% de 49 vacas inseminadas con Charolés, 20% de 191 vacas inseminadas con semen de Blanco Azul Belga, 19% de 89 vacas inseminadas con semen de Piamontés y 10% de 304 vacas inseminadas con Limusín (Almería *et al.*, 2009a) (figura 2). El menor riesgo de aborto fue observado en las vacas seropositivas que presentaban bajos títulos de anticuerpos inseminados con semen de la raza Limusín, que

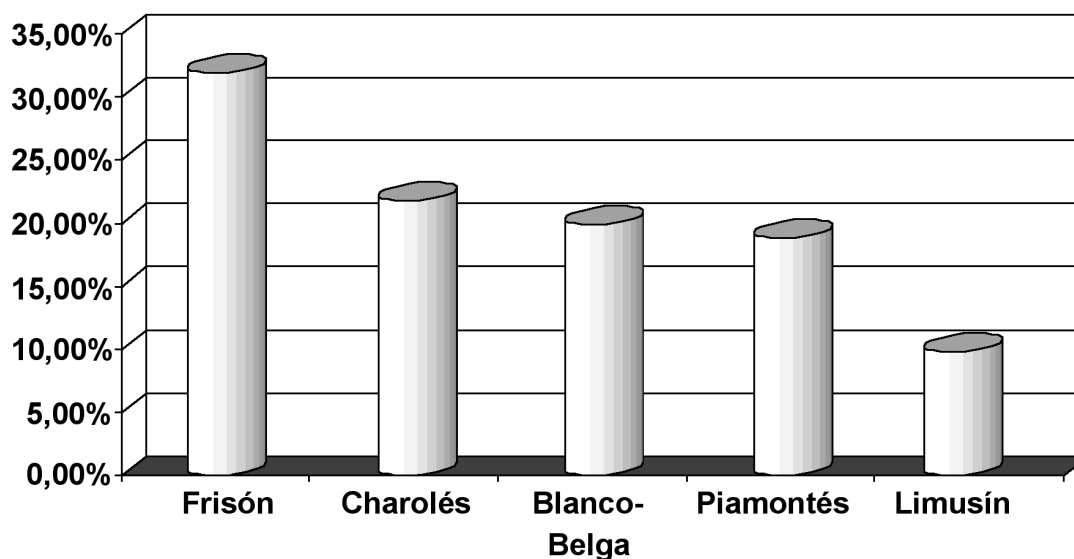


Figura 2. Tasas de aborto en vacas seropositivas inseminadas artificialmente con semen de diferentes razas (Frisón, Charolés, Blanco-Belga, Piamontés y Limusín)

Figure 2. Abortion rates of seropositive cows artificially inseminated with semen of several breeds (Friesian, Charolais, Belgian-Blue, Piedmontese and Limousin)

presentaron tasas de aborto similares a las de las vacas seronegativas (2,1%, 3/145, y 3,2%, 239/7432, respectivamente).

El hecho de que las gestaciones cruzadas reduzcan el riesgo de aborto asociado a *N. caninum* podría estar ligado a un mayor bienestar placentario en dichos animales. Se ha observado que la gestación cruzada favorece la producción de PAG-1 durante el periodo de gestación. De hecho un estudio reciente ha demostrado que las vacas de raza frisona inseminadas con semen de Limusín presentan niveles de PAG-1 significativamente más elevados que las vacas con gestaciones frisonas puras (Serrano *et al.*, 2009). Dado que las PAG-1 parecen tener propiedades inmunosupresoras, al menos a nivel uterino (Wooding *et al.*, 2005), las concentraciones más elevadas de PAG-1 pueden reflejar mecanismos para evitar el rechazo materno durante la gestación y compensar la distancia genética que existe con el feto en estas gestaciones cruzadas. Este mecanismo podría actuar reforzando la barrera placentaria e impidiendo el paso transplacentario de *N. caninum* y la infección del feto.

Por otro lado, nuestros resultados indican que ciertas razas, en concreto la raza Limusín, son menos susceptibles a la infección por *N. caninum* que otras. En un estudio epidemiológico la raza Limusín presentó seroprevalencia 6,7 veces menor que otras razas de doble propósito o razas de carne en el mismo sistema de manejo extensivo (Armengol *et al.*, 2007). Por tanto, se recomienda el uso de semen Limusín en la IA de animales seropositivos en las explotaciones con alta seroprevalencia frente *N. caninum*.

#### Estrategias de control de la neosporosis bovina

Como medidas de control de la enfermedad en las explotaciones de ganado vacuno en

las que las pérdidas económicas son importantes, dado que no hay un tratamiento eficaz, es fundamental prevenir la propagación de la infección, evitando tanto la transmisión horizontal como la vertical y ello debe basarse en el control continuado de los animales positivos. El control serológico anual de todos los animales de una explotación con alta incidencia de abortos relacionados con *N. caninum* ayudará a reconocer los animales seropositivos y la titulación de los mismos frente al parásito. Se recomienda el control y la eliminación de los animales seropositivos con mayores títulos de anticuerpos de la explotación, especialmente si han tenido abortos previos. También es recomendable la inseminación de los animales seropositivos que se quieran mantener en la explotación con semen de toros de razas cárnicas, especialmente de la raza Limusín, para garantizar la eliminación de la descendencia de las vacas infectadas y reducir el nivel de seroprevalencia y los abortos asociados con *N. caninum*. Por supuesto, para que estas medidas tengan éxito a largo plazo deberán ir acompañadas de otras medidas, tales como evitar el acceso de perros y cánidos silvestres a las placentas y a las zonas de alimento. El control analítico de los animales que se van a introducir en la explotación deben ser también medidas esenciales preventivas y de control frente a esta enfermedad (Dubey *et al.*, 2007). Finalmente, en animales infectados valiosos, la transferencia de embriones a hembras seronegativas es una medida complementaria recomendada (Baillargeon *et al.*, 2001).

#### Agradecimientos

Estos trabajos han sido subvencionados por los proyectos CICYT: AGL2000-0904, AGL2004-06103 and AGL2007-65521.

## Referencias

- 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. J. Am. Vet. Med. Assoc., 198: 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.
- 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, Vidal D, Ferrer D, Pabón M, Fernández-de-Mera MI, Ruiz-Fons F, Alzaga V, Marco I, Calvete C, Lavin S, Gortazar C, López-Gatius F, Dubey JP, 2007. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. Vet Parasitol., 143: 21-28.
- Almería S, Nogareda C, Santolaria P, García-Ispuerto I, Yániz JL, López-Gatius F, 2009b. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. Vet. Immunol. Immunopathol., 130: 35-42.
- Almería S, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Nogareda C, Bech-Sàbat G, Serrano, B, Santolaria P, Yániz JL, 2009a. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. Vet. Parasitol., 163: 323-329.
- Armengol R, Pabón M, Santolaria P, Cabezón O, Adelantado C, Yániz J, López-Gatius F, Almería S, 2007. Low seroprevalence of *Neospora caninum* infection associated with the Limusine breed in cow-calf herds in Andorra, Europe. J. Parasitol., 93: 1029-1032.
- Baillargeon P, Fecteau G, Paré J, Lamothe P, Sauve 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. J. Am. Vet. Med. Assoc., 218: 1803-1806.
- Barberán M, Cebrián L, Gil J, 1997. Identificación de *Neospora* sp. en brotes de aborto en ganado bovino en Aragón. ITEA 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. J. Am. Vet. Med. Assoc., 217: 1361-1365.
- Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA, 1991. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet. Pathol., 28: 110-116.
- Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson ML, Reynolds J, Chauvet AE, 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.
- Bartels CJ, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Björkman C, Frössling J, von Blumröder 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.
- Bech-Sàbat G, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispuerto I, Pabón M, Nogareda C, Yániz JL, Almería S, 2007. Progesterone supplementation during mid-gestation increases the risk of abortion in *Neospora*-infected dairy cows with high antibody titres. Vet. Parasitol., 145: 164-167.
- Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J, 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd., 70: 271-274.
- Brand JM, Frohn C, Cziupka K, Brockmann C, Kirchner H, Luhm J, 2004. Prolactin triggers pro-inflammatory immune responses in peripheral immune cells. Eur. Cytokine Netw., 15: 99-104.

- Corbellini LG, Pescador CA, Frantz F, Wunder E, Steffen D, Smith DR, 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: 1683-1689.
- Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wouda W, Barkema HW, 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.*, 31: 747-752.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W, 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J. Comp. Path.*, 134: 267-89.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM, 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20: 323-367.
- Druckmann R, Druckmann MA, 2005. Progesterone and the immunology of pregnancy. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 97: 389-396.
- Ferre I, Aduriz G, del-Pozo I, Regidor-Cerrillo J, Atxaerandio R, Collantes-Fernández E, Hurtado A, Ugarte-Garagalza C, Ortega-Mora LM, 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, 63: 1504-1518.
- Fondevila D, Añor S, Pumarola M, Dubey JP, 1998. *Neospora caninum* identification in an aborted bovine fetus in Spain. *Vet. Parasitol.*, 77: 187-190.
- García-Ispuerto I, López-Gatius F, Almería S, Yáñez J, Santolaria P, Serrano B, Bech-Sabat G, Nogareda C, Sulon J, de Sousa NM, Beckers JF, 2009. Factors affecting plasma prolactin concentrations throughout gestation in high producing dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 36: 57-66.
- Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE, 2004a. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 34: 159-161.
- Gondim LFP, McAllister MM, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME, 2004b. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *J. Parasitol.*, 90: 1361-1365.
- Gonzalez L, Buxton D, Atxaerandio R, Aduriz G, Maley S, Marco JC, Cuervo LA, 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet. Rec.*, 144: 145-150.
- Hattel AL, Castro MD, Gummo JD, Weinstock D, Reed JA, Dubey JP, 1998. Neosporosis-associated bovine abortion in Pennsylvania. *Vet. Parasitol.*, 74: 307-313.
- Häsler B, Hernandez JA, Reist M, Sager H, Steiner-Moret C, Staubli D, Stärk KD, Gottstein B, 2006. *Neospora caninum*: Serological follow-up in dairy cows during pregnancy. *Vet. Parasitol.*, 137: 222-230.
- Hurková L, Modrý D, 2006. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. *Vet. Parasitol.*, 137: 150-154.
- Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D, 2005. The host parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 108: 29-36.
- Kashiwazaki Y, Giannechini RE, Lust M, Gil J, 2004. Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Vet. Parasitol.*, 120: 139-144.
- 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 Infect. Dis. Vet. Public Health.*, 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.



- López-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, 52: 51-53.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo 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.
- López-Gatius F, García-Ispierto I, Santolaria P, Yániz JL, López-Béjar M, Nogareda C, Almería S, 2005c. Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. J. Vet. Med. B, 52: 147-152.
- López-Gatius F, Garbayo JM, Santolaria P, Yániz JL, Almería S, Ayad A, de Sousa NM, Beckers JF, 2007a. Plasma pregnancy-associated glycoprotein-1 (PAG-1) concentrations during gestation in *Neospora*-infected dairy cows. Theriogenology, 67: 502-508.
- López-Gatius F, Almería S, Donofrio G, Nogareda C, García-Ispierto I, Bech-Sàbat G, Santolaria P, Yániz JL, Pabón M, de Sousa NM, Beckers JF, 2007b. Protection against abortion linked to gamma interferon production in pregnant dairy cows naturally infected with *Neospora caninum*. Theriogenology, 68: 1067-1073.
- Mainar-Jaime RC, Thurmond MC, Berzal-Herranz B, Hietala SK, 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. Vet. Rec., 145: 72-75.
- Marco I, Ferroglio E, López-Olvera JR, Montané J, Lavín S, 2008. High seroprevalence of *Neospora caninum* in the red fox (*Vulpes vulpes*) in the Pyrenees (NE Spain). Vet. Parasitol., 152: 321-324.
- 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.
- Moskwa B, Cabaj W, Pastusiak K, Bien J, 2003. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. Acta Parasitol., 48: 138-141.
- Moskwa B, Pastusiak K, Bien J, Cabaj W, 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. Parasitol. Res., 100: 633-636.
- Nogareda C, López-Gatius F, Santolaria P, García-Ispierto I, Bech-Sàbat G, Pabón M, Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida JA, Yániz J, Almería S, 2007. Dynamics of anti-*Neospora caninum* antibodies during gestation in chronically infected dairy cows. Vet. Parasitol., 148: 193-199.
- Pabón M, López-Gatius F, García-Ispierto I, Bech-Sàbat G, Nogareda C, Almería S, 2007. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. Vet. Parasitol., 147: 40-46.
- Patel OV, Sulon J, Beckers JF, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N, Domeki I, 1997. Plasma bovine pregnancy-associated glycoprotein concentrations throughout gestation in relationship to fetal number in the cow. Eur. J. Endocrinol., 137: 423-428.
- Peregrine AS, Duffield TF, Wideman G, Kelton D, Hobson J, Cramer G, Hietala SK, 2004. Udder health in dairy cattle infected with *Neospora caninum*. Prev. Vet. Med., 64: 101-112.
- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Alvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM, 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. Vet. Parasitol., 111: 143-152.
- Peters M, Lutkefels E, Heckerroth AR, Schares G, 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. Int. J. Parasitol., 31: 1144-1148.
- Pfeiffer DU, Williamson NB, Reichel MP, Wichtel JJ, Teague WR, 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. Prev. Vet. Med., 54: 11-24.
- Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Tabares E, Innes EA, González-Paniello R, Ortega-Mora LM, 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cattle and beef cattle in Spain. Int. J. Parasitol., 29: 1201-1208.

- Quintanilla-Gozaló A, Pereira-Bueno J, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega-Mora LM, 2000. Observational studies on *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int. J. Parasitol.*, 30: 900-906.
- Serrano B, López-Gatius F, Santolaria P, Almería S, García-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Sulon J, de Sousa NM, Beckers JF, Yáñez JL, 2009. Factors Affecting Plasma Pregnancy-associated Glycoprotein 1 Concentrations Throughout Gestation in High-producing Dairy Cows. *Reprod. Domest. Anim.* doi: 44: 600-605.
- Simpson VR, Monies RJ, Riley P, Cromey DS, 1997. Foxes and neosporosis. *Vet. Rec.*, 141: 308-9.
- Sobrino R, Dubey JP, Pabón M, Linarez N, Kwok OC, Millán J, Arnal MC, Luco DF, López-Gatius F, Thulliez P, Gortázar C, Almería S, 2008. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.*, 155: 190-197.
- 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, Davison HC, Innes EA, Wastling JM, 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.*, 29: 1195-1200.
- Waldner CL, 2005. Serological status for *N. caninum*, bovine viral diarrhoea virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus at pregnancy testing and reproductive performance in beef herds. *Anim. Reprod. Sci.*, 90: 219-242.
- Wapenaar W, Jenkins MC, O'Handley RM, Barke-HW, 2006. *Neospora caninum*-like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). *J. Parasitol.*, 92: 1270-1274.
- Williams DJ, 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.
- Wooding FBP, Roberts RM, Green JA, 2005. Light and electron microscope immunocytochemical studies of the distribution of pregnancy associated glycoproteins (PAGs) throughout pregnancy in the cow: Possible functional implications. *Placenta*, 26: 807-827.
- Wouda W, Moen AR, Visser IJ, 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.
- Yáñez JL, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Bech-Sabat G, Serrano B, Nogareda C, Sanchez-Nadal JA, Almería S, Santolaria P, 2009. The factors affecting the abortion rate in dairy herds with high incidence of *Neospora*-associated abortions are different in cows and heifers. *Reprod. Domestic Animals* (in press) doi:10.1111/j.1439-0531.2008.01337.x.
- Zarrouk A, Engeland I, Sulon J, Beckers JF, 1999. Pregnancy-associated glycoprotein levels in pregnant goats inoculated with *Toxoplasma gondii* or *Listeria monocytogenes*: a retrospective study. *Theriogenology*, 52: 1105-1114.

(Aceptado para publicación el 19 de junio de 2009).