

Detección de *Neospora caninum* en ganado lechero sacrificado en Aguascalientes, México

Detection of *Neospora caninum* from slaughtered dairy cattle in Aguascalientes, Mexico

Leticia Esperanza Medina Esparza^{a*}

Ricardo de Luna Oseguera^a

Irene Victoria Vitela Mendoza^a

Carlos Cruz Vázquez^a

^a Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, Tel.: +52 449 962 11 00; fax: +52 449 962 11 00, Km 18 carretera Aguascalientes - San Luis Potosí, El Llano, 20330, Aguascalientes, México.

* Autor de correspondencia: lmedinaesparza@yahoo.com.mx

● **Resumen:**

Con el objetivo de detectar la presencia de *Neospora caninum* en tejidos, suero y sangre periférica de ganado lechero sacrificado en rastros de Aguascalientes, México, se colectaron muestras de médula espinal, corazón, hígado, sangre y suero sanguíneo de 71 animales adultos. Las muestras de suero se procesaron mediante la prueba de ELISA para detectar anticuerpos anti-*N. caninum*, mientras que las otras se sometieron a la prueba de PCR anidado para determinar la frecuencia de ADN del parásito en los diferentes tejidos, así como en sangre. La frecuencia general de animales seropositivos fue de 41 % (29/71; IC 95% 29-53) con un rango de 33 a 57 %. La frecuencia de detección de ADN de *N. caninum* en sangre fue 44 % (31/71; IC 95% 32-55), con un rango entre 38 y 50 %; en las muestras de médula espinal de 32 % (27/71; IC 95% 27-50), con un rango de 2 a 38 %; en las muestras de corazón, 22 % (16/71; IC 95% 13-34), con un rango de 4 a 33 %; y en las de hígado, 32 % (23/71; IC 95% 22-44), con un

rango de 28 a 57 %. La concordancia entre la prueba de ELISA y la de PCR en sangre fue $k= 0.36$, de ELISA y PCR en tejidos $k= 0.07$ y de PCR en sangre y PCR en tejidos $k= 0.61$. Únicamente 11 vacas fueron positivas a las tres pruebas.

● **Palabras clave:** *Neospora caninum*, Ganado lechero, ADN, PCR, Sangre, Tejidos.

● **Abstract:**

The objective was to detect the presence of *Neospora caninum* in tissues, serum and peripheral blood of slaughtered dairy cattle in abattoirs of Aguascalientes, Mexico. Samples of spinal cord, heart, liver, blood and blood serum were collected from 71 adult animals and were processed as follow. Serum samples were processed by ELISA to detect anti-*N. caninum* antibodies, while the others were subjected to the nested PCR test to determine the frequency of parasite DNA in different tissues as well as blood. Overall frequency of seropositive animals was 41 % (29/71, 95% CI 29-53) with a range of 33 to 57 %. The frequency of detection of *N. caninum* DNA in the blood was 44 % (31/71, 95% CI 32-55), with a range between 38 and 50 %; in spinal cord samples of 32 % (27/71, 95% CI 27-50), with a range of 2 to 38 %; in heart samples, 22 % (16/71, 95% CI 13-34), with a range of 4 to 33 %, and in the liver samples, 32 % (23/71, 95% CI 22- 44), with a range of 28 to 57 %. The concordance between the ELISA test and PCR in blood was $k= 0.36$, of ELISA and PCR in tissues $k= 0.07$ and of PCR in blood and PCR in tissues $k = 0.61$. Only eleven cows were positive for all three tests.

● **Key words:** *Neospora caninum*, Dairy cattle, DNA, PCR, Blood, Tissues.

Recibido 24/06/17.

Aceptado 08/11/2017.

❖ Introducción ❖

Neospora caninum (*Apicomplexa*, *Sarcocystidae*), es un parásito protozoario que afecta a una amplia variedad de animales domésticos y silvestres; es particularmente importante en el ganado, ya que puede causar abortos, muerte neonatal, muerte fetal y reabsorción

embrionaria temprana; afecta principalmente al ganado productor de leche y se encuentra ampliamente distribuido en Europa, Asia, África y en el Continente Americano, provocando cuantiosas pérdidas económicas. El ciclo de vida de *N. caninum* es heteroxeno, en el cual el perro doméstico y el coyote aparecen como los principales huéspedes definitivos, mientras que el ganado y un amplio rango de animales, tanto domésticos como silvestres, pueden actuar como huéspedes intermediarios. Los herbívoros pueden infectarse mediante la ingestión de alimento y agua contaminados con ooquistes excretados por el huésped definitivo, en tanto que las hembras crónicamente infectadas, así como las infectadas horizontalmente, pueden transmitir el parásito al feto a través de la placenta con una elevada eficiencia⁽¹⁻⁴⁾. La infección transplacentaria endógena puede causar muerte del feto en el útero, aborto o el nacimiento de crías clínicamente enfermas o clínicamente sanas pero persistentemente infectadas, siendo estas últimas las que en la edad adulta actúan como agentes que permiten el mantenimiento de la infección en el hato⁽⁵⁾.

Diversos estudios han documentado la respuesta inmune a *N. caninum* tanto a la infección aguda como a la crónica (recrudescencia), y mediante técnicas moleculares se ha detectado ADN del parásito en muestras de tejidos de fetos abortados^(2,6); sin embargo, son limitados los estudios en donde se demuestra la presencia de ADN de *N. caninum* en muestras de tejidos provenientes de animales con infección natural asintomáticos, aunque ha sido posible aislar el parásito de becerros y vacas naturalmente infectados^(2,7-9).

El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de anticuerpos anti- *N. caninum* en suero, y de ADN en sangre periférica y tejidos de ganado lechero sacrificado en tres rastros de Aguascalientes, México.

❖ Material y métodos ❖

● Sitio de estudio ●

El trabajo se desarrolló en tres rastros, uno municipal y dos particulares, localizados en el municipio de San Francisco de los Romo, en el estado de Aguascalientes, México, el cual se encuentra localizado en la región centro-norte de México; en estos

establecimientos se sacrifica ganado bovino proveniente de los once municipios del mismo estado.

● **Colecta de muestras** ●

Se asistió una vez por mes a cada uno de los rastros durante un periodo de tres meses; durante cada visita se seleccionaron al azar solamente las vacas adultas que de acuerdo con los registros del rastro provenían de establos lecheros ubicados en el estado de Aguascalientes. Antes del sacrificio se identificó a cada una de las vacas que se incluyó en el estudio y se procedió a coleccionar una muestra de sangre periférica con equipo Vacutainer nuevo sin anticoagulante y otra en tubos adicionados con EDTA. Después del sacrificio, se tomaron de manera aséptica muestras de médula espinal al momento de la decapitación, así como de corazón e hígado durante la evisceración de la canal. Todos los materiales usados en la colección de los tejidos se desinfectaron antes de cada toma de muestra con una solución de hipoclorito de sodio (2.5%) y se lavaron con agua destilada. Todas las muestras debidamente identificadas se transportaron en condiciones de refrigeración al laboratorio de Sanidad Fitopecuaria del Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes, en donde las muestras de tejido y sangre con EDTA se congelaron a -40 °C hasta su uso; en tanto que de las muestras de sangre sin anticoagulante, se obtuvo el suero sanguíneo mediante centrifugación a 1,000 xg por 15 min; el suero se colocó en viales Eppendorf y se congeló a -20 °C hasta su uso.

● **Prueba serológica** ●

Un total de 71 muestras de suero sanguíneo se procesaron mediante la técnica de ELISA indirecta para detectar anticuerpos anti-*N. caninum*, empleando un paquete comercial (IDDEX Neospora X2, IDDEX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante; el punto de corte para considerar una muestra positiva fue de ≥ 0.50 . Los cálculos se realizaron con el software provisto por el fabricante.

● Extracción de ADN ●

La obtención de ADN de las muestras de sangre se realizó mediante el uso del paquete comercial Ultraclean DNA BloodSpin (MOBIO Laboratories Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. En tanto que el ADN de las muestras de médula espinal, corazón e hígado se obtuvo mediante una extracción “in house”, de forma aséptica, de la siguiente forma: una muestra de aproximadamente 4 cm³ del tejido congelado se trituró en un mortero estéril, de aquí se tomó 1 ml y se colocó en un tubo Eppendorf al que se agregaron 500 µl de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 8.0; NaCl 0.4 M; Na₂EDTA 2 mM pH8.0), 50 µl de SDS 10% y 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml); los tubos se incubaron a 55 °C durante 24 h y posteriormente se agregaron 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubaron por 3 h más. Al término de este tiempo se agregaron 200 µl de NaCl 5M y los tubos se centrifugaron a 1,300 xg por 15 min recuperando el sobrenadante y colocándolo en un tubo Eppendorf nuevo, al cual se añadieron 760 µl de isopropanol frío mezclando suavemente hasta homogenizar, dejando reposar 10 min a 4 °C. Luego se centrifugaron los tubos a 1,300 xg por 15 min descartando el sobrenadante. La pastilla obtenida se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 1,000 xg por 10 min, retirando con cuidado el etanol dejando secar la pastilla a temperatura ambiente durante 30 min; el ADN fue resuspendido en 100 µl del buffer TE.

● Detección de ADN ●

Las muestras de ADN de los 71 animales, se procesaron mediante PCR anidado en un solo tubo, siguiendo el protocolo de Ellis *et al*⁽¹⁰⁾ utilizando los iniciadores NF1, NS2, NR1 y SR1, con controles positivos y negativos⁽¹¹⁾. La concentración de ADN de cada muestra se verificó utilizando un espectrofotómetro de luz UV y 5 µl de la muestra conteniendo 2 µg de ADN se usó en la PCR. Los productos de la amplificación fueron resueltos en un gel de agarosa al 2.5% junto con un marcador de peso molecular (Phix 174 DNA, Invitrogen Inc.) para estimar el peso de los productos; los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron utilizando luz UV. Todos los procedimientos se llevaron

a cabo en una cámara con luz UV utilizando material nuevo estéril en cada muestra. Se consideró como positiva una muestra si se amplificaba una banda de 146 pb.

● Análisis de los datos ●

Se calculó la frecuencia de animales que resultaron positivos a la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum*, así como la frecuencia de la detección de ADN en sangre periférica, médula espinal, corazón e hígado. Se calculó el coeficiente kappa con el objetivo de estimar la concordancia entre las pruebas ($P < 0.05$).

❖ Resultados ❖

La frecuencia de casos positivos a la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* fue 41 % (29/71; IC 95% 29-53), con un rango de 33 a 57 %; estos animales provenían de establos lecheros de cuatro de los once municipios del estado. El 49 % de los animales procedían del municipio de Aguascalientes; sin embargo, la frecuencia más alta correspondió a los animales provenientes del municipio de Pabellón de Arteaga (Cuadro 1).

Cuadro 1: Detección de *N. caninum* en tejidos y suero sanguíneo de vacas sacrificadas en tres rastros del estado de Aguascalientes, México, mediante pruebas de PCR y ELISA

Municipio	Animales examinados	Frecuencia (%)	PCR sangre Frecuencia (%)	PCR médula Frecuencia (%)	PCR corazón Frecuencia (%)	PCR hígado Frecuencia (%)
Aguascalientes	35	43	46	34	17	28
Pabellón de A.	7	57	43	28	14	57
San Francisco	21	33	38	38	33	28
Jesús María	8	37	50	12	25	37
Total	71	41	44	32	22	32

La frecuencia de la detección de ADN de *N. caninum* en sangre fue de 44 % (31/71; IC 95% 32-55), con un rango entre 38 y 50 %; la frecuencia más alta se detectó en las vacas del municipio de Jesús María. Se examinaron 213 muestras de tejido provenientes de las 71 vacas incluidas en el estudio; ningún animal se encontró gestante. En las muestras de médula espinal, la frecuencia de detección de ADN del parásito fue de 32 % (27/71; IC 95% 27-50), con rango 2 a 38 %. En las muestras de corazón, la frecuencia fue de 22 % (16/71; IC 95% 13-34), con rango de 4 a 33 %, y en las muestras de hígado, la frecuencia fue 32 % (23/71; IC 95% 22-44) con rango de 28 a 57 %.

La concordancia entre las pruebas de ELISA y PCR para la detección de ADN en sangre fue $k= 0.36$ (IC 95% 13-59); se encontró que 27 % (19/71; IC 95% 17-38) de las vacas resultaron positivas a ambas pruebas. La concordancia entre ELISA y PCR en tejidos fue $k= 0.07$ (IC 95% 15-30); el 20 % (14/71; IC 95% 11-31) de las muestras fueron positivas a la prueba serológica y al menos uno de los tejidos a PCR. La concordancia entre PCR en tejidos y en sangre fue $k= 0.61$ (IC 95% 40-83); 31 % (22/71; IC 95% 20-43) fueron positivas a ambas pruebas. En los animales estudiados se observó que 15 % (11/71; IC 95% 8-26) fueron positivos a todas las pruebas, 1 % (1/71; IC 95% 0.07-8) a la prueba de PCR en tejidos, 28 % (20/71; IC 95% 18-40) a la prueba de PCR en sangre, 25 % (18/71; IC 95% 16-37) a la prueba de ELISA y 30 % (21/71; IC 95% 19-41) fueron negativos a las tres pruebas.

❖ Discusión ❖

En México, la neosporosis bovina es actualmente considerada endémica y con una amplia distribución geográfica^(12,13), mientras que en el estado de Aguascalientes, México, se ha reportado en el ganado lechero una alta proporción de animales positivos a la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum*, que ha estado en un rango de 30 a 59 %, mientras que en los perros asociados a los establos la proporción ha sido de 40 %⁽¹⁴⁻¹⁷⁾; además, utilizando herramientas moleculares se ha confirmado una alta frecuencia en fetos abortados (80 %), así como una diversidad genética singular^(11,18). La frecuencia general de animales seropositivos que se observó en el presente estudio fue 41 %, mientras que los resultados obtenidos en las pruebas de PCR en médula espinal e hígado mostraron que 32 % de los animales fueron positivos, en corazón el 22 %, en tanto que la frecuencia de detección de ADN en sangre fue de 44 %.

La frecuencia general de animales seropositivos que se determinó en este trabajo, se ubica dentro del rango que históricamente se ha registrado en el estado de Aguascalientes, que ha sido entre el 30 y 59 %^(14,15,17) y la también elevada frecuencia del hallazgo de ADN en las muestras de tejido analizadas y en sangre periférica, confirman que el ganado estuvo expuesto a la infección por *N. caninum*; es entonces evidente que la presencia de la infección por este parásito se ha mantenido elevada en los municipios que integran la cuenca lechera de Aguascalientes, y que por ello el riesgo de aborto así como de la transmisión endógena del parásito a las crías debe de considerarse importante como ha sido sugerido en la literatura⁽¹⁹⁾ y en trabajos previos desarrollados en Aguascalientes^(14,17). Las vacas lecheras incluidas en este trabajo, fueron enviadas al rastro por causas que no pudieron ser documentadas al llegar al mismo, pero todas ellas en la revisión ante-mortem se observaron clínicamente sanas y post-mortem no se encontraron gestantes, es decir, eran animales asintomáticos a la infección por *N. caninum*. Interesante, que en este estudio se identificaron animales seronegativos pero positivos a PCR en sangre (14 %) o en tejidos (24 %), lo que sugiere que la frecuencia de animales seropositivos a *N. caninum* puede estar subestimada. En un estudio desarrollado en vaquillas de carne, se encontraron resultados similares, animales seronegativos pero positivos a la detección de ADN en cerebro⁽⁷⁾, y cuando en el rastro fueron estudiadas post-mortem vacas seronegativas, se encontraron sus fetos positivos a la presencia de ADN⁽²⁰⁾. La interpretación de este tipo de hallazgos sigue siendo controversial; la existencia de animales seronegativos pero positivos a la presencia de ADN en sangre sugiere una infección temprana o tolerancia inmunológica⁽²¹⁾; la presencia de ADN del parásito en sangre es indicativo de una infección activa que puede inducir el aborto o la transmisión endógena del parásito a las crías independientemente del estatus serológico de los animales, es decir, que ganado seronegativo puede tener crías seropositivas debido a que sufren una infección crónica^(20,22).

La concordancia entre la prueba de ELISA y la de PCR en sangre fue $k= 0.36$, considerada mediana; en otros estudios este valor ha tendido a ser de pobre a moderado^(21,23,24). En la literatura se ha documentado que la circulación de taquizoitos de *N. caninum* en sangre periférica es pulsátil^(25,26), por lo que esta prueba debe de complementarse con alguna otra de tipo serológico. La concordancia entre la prueba de ELISA y PCR en tejidos fue $k= 0.07$, es leve; sin embargo, en la literatura se indica que vacas seropositivas tendrían fetos positivos a la prueba de PCR en tejido encefálico y más probabilidades de abortar^(19,20). En cuanto a la concordancia entre las pruebas de PCR en sangre y PCR en tejidos el coeficiente fue $k= 0.61$, considerado moderado; como se comentó, cuando se detecta ADN en sangre es indicativo de una infección activa^(25,26). Esta concordancia puede tomarse como un indicador para revalorar el uso de la detección de ADN en sangre en animales vivos como adecuado marcador de una infección activa, y que si se combina con la prueba serológica de IFI considerando títulos $\geq 1:1600$ ⁽⁵⁾,

pueden indicar altas probabilidades de transmisión transplacentaria y eventualmente el riesgo de aborto. Finalmente, debe mencionarse que únicamente 15 % (11/71) de los animales resultaron positivos a las tres pruebas, dato que concuerda con los coeficientes de concordancia observados. Hasta donde se sabe, éste es el primer reporte sobre la detección de ADN de *N. caninum* en animales naturalmente infectados y asintomáticos después de su sacrificio, y se considera que los resultados obtenidos son un reflejo de la situación que guarda la infección por este parásito en los hatos lecheros del estado de Aguascalientes.

❖ Conclusiones e implicaciones ❖

Este trabajo permitió detectar en animales asintomáticos post-mortem la presencia de la infección por *N. caninum*, lo que contribuye a documentar la situación epidemiológica de la misma en una zona ganadera con alta exposición al parásito. La identificación de una alta proporción de animales positivos a la infección conlleva el riesgo de aborto y de transmisión endógena a las crías, lo que permite la perpetuación de la enfermedad en los hatos ganaderos.

❖ Agradecimientos ❖

Se agradece a las autoridades administrativas de los rastros en que se desarrolló el trabajo, así como al personal de los mismos por las facilidades otorgadas. Este proyecto fue financiado por el Tecnológico Nacional de México (4559.12-P).

● **Literatura citada:**

1. Dubey JP, Buxton D, Wouda, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol* 2006;134(4):267–289.
2. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals-the last five years. *Vet Parasitol* 2011;180(1-2):90–108.
3. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infect Genet Evol* 2013;13(1):133–150.
4. Reichel MP, Ayanegui-Alcérreca A, Gondim LFP, Ellis J. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion dollar question. *Int J Parasitol* 2013;43(2):133–142.
5. McAllister MM. Diagnosis and control of bovine neosporosis. *Vet Clin Food Anim* 2016;32(2):443–463.
6. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev* 2007;120(2):323–367.
7. Santos SL, de Souza Costa K, Gondim LQ, da Silva MS, Uzeda RS, Abe-Sandes K, *et al.* Investigation of *Neospora caninum*, *Hammondia* sp., and *Toxoplasma gondii* in tissues from slaughtered beef cattle in Bahia, Brazil. *Parasitol Res* 2010;106(2):457–461.
8. Campero LM, Venturini MC, Moore DP, Massola L, Lagomarsino H, García B, *et al.* Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. *Exp Parasitol* 2015;155(1):8-12.
9. Oliveira S, Soares RM, Aizawa J, Soares HS, Chiebao DP, Ortega-Mora LM, *et al.* Isolation and biological and molecular characterization of *Neospora caninum* (NC-SP1) from a naturally infected adult asymptomatic cattle (*Bos taurus*) in the state of Sao Paulo, Brazil. *Parasitology* 2017;11(6):1-5.
10. Ellis JT, McMillan D, Ryce C, Payne S, Atkinson R, Harper PAW. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay from the detection of *Neospora caninum* DNA. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1589–1596.
11. Medina EL, Cruz-Vázquez C, Quezada TT, Morales SE, García-Vázquez Z. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol* 2006;136(3-4):187–191.

12. García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Ramos-Aragón A, Cruz-Vázquez C, Mapes G. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Vet Parasitol* 2005;134(1-2):61-65.
13. García-Vázquez C, Rodríguez-Vivas I, Romero D, Fernández-Ruvalcaba M, Cruz-Vázquez C. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies in beef cattle in three southern states of Mexico. *Trop Anim Health Prod* 2009;41(5):749-753.
14. García-Vázquez Z, Cruz-Vázquez C, Medina EL, García-Tapia D, Chavarría-Martínez B. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol* 2002;106(2):115-120.
15. Gutiérrez GJ, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Valdivia-Flores A, Islas-Ojeda E, García-Vázquez Z. Factores de manejo asociados con la seroprevalencia a la infección por *Neospora caninum* en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Vet Mex* 2007;38(3):261–270.
16. Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Marentes A, Morales-Salinas E, García-Vázquez Z. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* infection in dogs found in dairy farms and urban areas of Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol* 2008;157(1-2):139–143.
17. Conzuelo SR, Medina-Esparza L, Ramos PM, García-Vázquez Z, Cruz-Vázquez C. Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Rev Mex Cienc Pecu* 2011;2(19):15-24.
18. Medina-Esparza L, Regidor-Cerrillo J, García-Ramos D, Álvarez-García G, Benavides J, Ortega-Mora LM, *et al.* Genetic characterization of *Neospora caninum* from aborted bovine foetuses in Aguascalientes, Mexico. *Vet Parasitol* 2016;228(1):183-187.
19. Almería S, López-Gatius F. Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. *Res Vet Sci* 2015;100(1):169-175.
20. Barbosa de Macedo CA, Barbosa de Macedo MFS, Cardim ST, Paiva CDCM, Taroda A, Barros LD, *et al.* *Neospora caninum*: evaluation of vertical transmission in slaughtered dairy cows (*Bos taurus*). *Rev Bras Parasitol Vet* 2013;22(1):13-17.
21. Howe L, West DM, Collett MG, Tattersfield G, Pattison RS, Pomroy WE, *et al.* The role of *Neospora caninum* in three cases of unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. *Small Ruminant Res* 2008;75(2-3):115–122.
22. Frössling J, Uggla A, Björkman C. Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. *Vet Parasitol* 2005;128(3-4):209–218.

23. Castañeda-Hernández A, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L. *Neospora caninum*: Seroprevalence and DNA detection in blood of sheep from Aguascalientes, Mexico. *Small Ruminant Res* 2014;119(1-3):182-186.
24. Mondragón-Zavala K, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Ramos-Parra M, García-Vázquez Z. *Neospora caninum* infection in beef cattle reared under grazing conditions in north-central Mexico. *Rev MVZ Córdoba* 2011;16(2):2484–2490.
25. Okeoma CM, Stowell KM, Williamson NB, Pomroy WE. *Neospora caninum*: Quantification of DA in the blood of naturally infected aborted and pregnant cows using real-time PCR. *Exp Parasitol* 2005;110(1):48-55.
26. Santana OI, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Ramos PM, Castellanos MC, Quezada GD. *Neospora caninum*: DNA detection in blood during first gestation of naturally infected heifers. *Vet Mex* 2010;41(2):131–137.