



# Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

---

---

**Instituto de Ciencias Agropecuarias**  
Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA**  
*Neospora caninum* **EN BOVINOS DE TRASPATIO**  
**DEL ESTADO DE HIDALGO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:**  
**NADIA PAULIN ORTIZ**

**ASESORES:**  
**DRA. PATRICIA BEATRIZ GARCÍA REYNA**  
**DR. FERNANDO OSNAYA GALLARDO**

**TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO. 2012**



# Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

---

---

**Instituto de Ciencias Agropecuarias**  
Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA**  
*Neospora caninum* **EN BOVINOS DE TRASPATIO**  
**DEL ESTADO DE HIDALGO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**  
**MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:**  
**NADIA PAULIN ORTIZ**

**ASESORES:**  
**DRA. PATRICIA BEATRIZ GARCÍA REYNA**  
**DR. FERNANDO OSNAYA GALLARDO**



**TULANCINGO DE BRAVO, HIDALGO. 2012**



**DR. OTILIO ARTURO ACEVEDO SANDOVAL**  
Director ICAP  
**Presente**

De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar de la UAEH, la tesis titulada **"FRECUENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum* EN BOVINOS DE TRASPATIO DEL ESTADO DE HIDALGO"** presentada por **C. NADIA PAULIN ORTIZ** con número de cuenta **117764**, egresada del Programa Educativo de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ha sido aprobada por el Jurado Examinador designado, por lo que se procede a su impresión y presentación en examen recepcional como requisito parcial para la obtención del título de Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia.

PRESIDENTE: Dr. Juan Ocampo López

SECRETARIO: Dra. Patricia Beatriz García Reyna

PRIMER VOCAL: Dr. J. Jesús Germán Peralta Ortiz

SEGUNDO VOCAL: Dra. Rosalinda Acosta Salina

TERCER VOCAL: Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

PRIMER SUPLENTE: Dr. Oscar Enrique del Razo Rodríguez

SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. José Ignacio Olave Leyva

REVISOR EXTERNO: Dr. Fernando Osnaya Gallardo

**ATENTAMENTE**  
**"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"**

**Tulancingo de Bravo, Hgo., 18 de enero de 2012**

**DRA. MARICELA AYALA MARTÍNEZ**  
Coordinadora del Programa Educativo de  
Medicina Veterinaria y Zootecnia

**DR. ARMANDO PELÁEZ ACERO**  
Jefe del Área Académica de  
Medicina Veterinaria y Zootecnia

C.c.p. Dr. Armando Peláez Acero.- Jefe del Área Académica de MVZ  
C.c.p. Archivo



## Dedicatoria

A mi hermano Melchor por ser como un padre y por que siempre brindo todo su apoyo, amor, cariño, comprensión, además de tener la confianza de creer en mí.

A mi madre por el apoyo que brindaste siempre y por ser un ejemplo de fortaleza. (TE QUIERO MUCHO).

A Delia por ser mas que una hermana, eres amiga, una segunda madre y por ser un sostén desde siempre.

A mis sobrinos, Fany, Fede y Adrian por que con sus sonrisas llenan mi vida de alegría, los quiero.

A tres mujeres excepcionales e importantes en mi vida, las Dra's. Paty, Rosy, y Mony, que siempre serán un ejemplo a seguir, siempre las he de querer.

A mis maestros por enseñarme que dos tipos de educación, la que enseña a ganarse la vida y la que enseña a vivirla.

A la Dra. Paty por confiar y creer en mí desde que me conoció, por inmiscuirme en sus actividades. Dra. Le agradezco infinitamente todo el apoyo que me brindo a lo largo de esta carrera y agradezco a Dios el que me permitiera conocer a una persona como usted, me ha dejado muchas enseñanzas; la quiero mucho es como otra madre.

## Agradecimientos

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por proporcionar a todos los maestros que contribuyeron en mi formación, en especial a los Dr's. Jesús, Paty, Rosy, Juan, Rosario, Víctor, Olave, Bernardo y Ericka por todos sus consejos, sus formidables clases, su paciencia y su amistad.

Investigación apoyada por el proyecto PROMEP-SEP-2007-2009 titulado "Determinar la seropositividad y diagnóstico molecular de *Neospora caninum* en bovinos del Valle de Tulancingo Hidalgo", y Cátedra CONS-207 FES-C UNAM.

Se agradece a los Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos de la Dirección General de Ganadería del Gobierno del Estado de Hidalgo por su valioso apoyo en la colección de muestras utilizadas en el presente estudio.

Agradezco al honorable jurado: Dra. Patricia, Dra. Rosalinda, Dr. Chuco, Dr. Juan, M. en C. Nacho, Dr. Víctor y al Dr. Oscar por brindar todas las facilidades así como sus lecciones para poder concluir este trabajo.

Agradezco al Dr. Fernando por contribuir en mi formación, por brindar disposición, paciencia y siempre hacerme sentir en confianza.

A mis compañeros de generación por pasar momentos buenos y malos que finalmente fueron enseñanzas en mi vida; así como también a mis

compañeros de laboratorio Lilia, Omar, José Luis, Luz Ma., Anabel, Liz, Zuraya y Ulises.

A mi jefe el Químico Álvaro Cerón Beltrán y a mis compañeros de trabajo, MVZ. Barbará, MVZ. Alejandro, Dr. Héctor, Emiliano y Karla por su comprensión y su valioso apoyo para poder culminar este trabajo.

A la Dra. Paty, Dra. Rosy, y al Dr. Juan por esos consejos y asesorías durante todos los momentos difíciles que pasé a lo largo de mi carrera y vida personal, su ayuda ha sido imprescindible así como también a la Dra. Mónica de Nova por ser la primera persona en confiar e involucrarme en un proyecto de investigación e infundir en mí el gusto y la inquietud por el trabajo de laboratorio.

Quienes con su confianza cariño y apoyo, sin estimar esfuerzo alguno, me han convertido en persona de provecho, ayudándome al logro de una meta.

Por compartir tristezas y alegrías, éxitos y fracasos; por todos los detalles que me han brindado durante mi vida como estudiante y por hacer de mi lo que soy.

**¡MIL GRACIAS!**

## ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Revisión de literatura	6
3.1 Aspectos históricos	6
3.2 Ciclo biológico	8
3.2.1 Fase de multiplicación rápida	8
3.2.2 Fase de multiplicación lenta	9
3.2.3 Fase de eliminación	10
3.3 Patogenia y transmisión en Bovinos	12
3.4 Epidemiología	16
3.5 Respuesta inmune	19
3.5.1 Relación parasito-hospedero	20
3.5.2 Inmunidad mediada por anticuerpos	21
3.5.3 Inmunidad mediada por células	21
3.6 Diagnóstico	23
4. Justificación	31
5. Objetivos	33
6. Material y métodos	34
6.1 Selección de muestras	34
6.2 Toma de muestras	36
6.3 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	36
6.4 Procedimiento	38
6.5 Evaluación de resultados	40
6.6 Validación de la prueba de ELISA	40
6.6.1 Interpretación de resultados	40



6.6.2 Análisis estadístico	42
7. Resultados	43
8. Discusión	48
9. Conclusiones	51
10. Literatura citada	52
11. Anexo	61

## 1. Resumen

El presente estudio se realizó en un total de 21 municipios localizados al sur del estado de Hidalgo, México de acuerdo a las siguientes regiones ecogeográficas: Valle del Mezquital (13), Valle de Tulancingo (5), Altiplano Pulquero (1) y Comarca Minera (2). El objetivo de la investigación fue determinar la frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* (*N. caninum*) en bovinos de traspatio del estado de Hidalgo. Se evaluaron 362 hembras gestantes  $\geq$  de 2 años de edad, consideradas de traspatio (Bovinos de Producción de leche). La detección de anticuerpos anti-*N. caninum* se realizó mediante la prueba de ELISA indirecta en muestras pareadas utilizando el *kit* (HerdChek<sup>MR</sup>, Lab. IDEXX), donde, las muestras de suero con cocientes S/P  $\geq$  a 0.5 se consideraron como positivos.

Los resultados mostraron una seropositividad del 58.01% del total de muestras colectadas (362) no encontrándose diferencias entre las diferentes regiones ( $P=0.4623$ ). En la región del Valle del Mezquital ( $n= 255$ ) se detectó una frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* de 60%, existiendo diferencias entre los municipios ( $P=0.0033$ ). El Valle de Tulancingo ( $n= 95$ ) presentó una frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* de 52.63% y no se detectaron diferencias entre los municipios ( $P=0.1273$ ). Del Altiplano Pulquero y la Comarca Minera ( $n=12$ ) se detectó una frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* del 58.33%, no existiendo diferencias entre los municipios ( $P=0.4244$ ).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una elevada seropositividad en animales de traspatio, así como una distribución amplia de la infección por *N. caninum*. Considerando que la selección de animales se dirigió

hacia hembras gestantes, existen coincidencias con los valores encontrados en hatos lecheros de otras entidades. La detección de anticuerpos anti-*N. caninum* por ELISA indirecta es importante para establecer el *status* epidemiológico que guarda la enfermedad. Actualmente, en el estado de Hidalgo sólo se tienen algunos antecedentes serológicos de la infección en hatos aislados, por lo que el presente trabajo de investigación contribuye a establecer la situación de la neosporosis en bovinos de traspatio del estado de Hidalgo. Se requieren de más estudios serológicos en todas las regiones del estado que permitan establecer las estrategias de control y prevención de la enfermedad, así como del seguimiento diagnóstico para la identificación del agente en animales infectados.

## 2. Introducción

Los problemas reproductivos caracterizados por infertilidad, muerte embrionaria, abortos, malformaciones congénitas, y neonatos nacidos débiles, son prevalentes en el ganado bovino ocasionando serias pérdidas económicas. Estos problemas reproductivos se relacionan a distintos agentes infecciosos como el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), el herpes bovino 1 (VHB-1) que es causa de la rinotraqueítis infecciosa bovina, el parásito protozoario *N. caninum* y bacterias como *Brucella sp.* y *Leptospira sp.*, los cuales se distribuyen ampliamente en la población bovina (Rivera *et al.*, 2004.)

En Australia, el 21% de 729 fetos abortados en vacas lecheras se asoció a *N. caninum* (Boulton *et al.*, 1995), y en hatos lecheros de California, en Estados Unidos, se encontró el 42.5% de seropositividad a *N. caninum* en 266 fetos abortados examinados (Anderson *et al.*, 1995). Actualmente, en Ontario, *N. caninum* es la causa infecciosa más común de aborto, registrándose 15% de abortos por esta causa en el Laboratorio de Salud Animal en la Universidad de Guelph (McEwen *et al.*, 2001). No todos los animales que son seropositivos a *N. caninum* presentan aborto, sin embargo, el riesgo del aborto para las vacas seropositivas se estimó que es dos veces mayor que para vacas seronegativas (Paré *et al.*, 1996). Por otro lado, en 68 vacas seropositivas se determinó un porcentaje del 26% de abortos y solamente el 3% de 117 vacas seronegativas (Atkinson *et al.*, 2000). En términos generales los animales seropositivos a *N. caninum* tienen de 3 a 4 veces mayor posibilidad de abortar que los animales seronegativos (Paré *et al.*, 1997; Moen *et al.*, 1998; y Corbellini *et al.*, 2002).

La transmisión vertical es la ruta primaria por la cual los bovinos se infectan con *N. caninum*. En el Reino Unido, se determinó una transmisión vertical a las crías del 95.2% en 118 vacas seropositivas (Bergeron *et al.*, 2000).

El alto índice de la transmisión vertical de *N. caninum* ha conducido a la recomendación de dar seguimiento a las vacas dentro del hato para la identificación de animales seropositivos y así poder reducir el número de animales infectados y las repercusiones sobre sus crías. Sin embargo, para los hatos con una alta incidencia, el desecho de todos los animales infectados dentro de un período de tiempo corto no es una manera práctica de eliminar *N. caninum* del hato. Lo que genera una necesidad de desarrollar estrategias optimas para reducir o limitar las infecciones por *N. caninum*.

La neosporosis bovina se diagnostica en bovinos adultos utilizando métodos indirectos como son la inmunofluorescencia indirecta y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) ó a través de métodos directos en donde se utilizan los tejidos de fetos abortados para evaluarse por histopatología y para la identificación de proteínas de *N. caninum* se utiliza la inmunohistoquímica o para la identificación de ADN recientemente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se considera una técnica altamente específica y sensitiva para la detección del parásito en los fetos (Sager *et al.*, 2001). El establecimiento de estas técnicas diagnósticas sensitivas en apoyo a la evaluación de los hatos de las distintas zonas lecheras de México es imprescindible para valorar el *status* de *N. caninum* y su impacto sobre la falla reproductiva y las consecuentes pérdidas económicas en la producción bovina. El diagnóstico indirecto a través de los estudios serológicos como la ELISA en animales sospechosos a *N. caninum* son

de gran utilidad por considerarse altamente sensibles y específicos y permitir establecer una evaluación del estado epidemiológico que guarda un hato o una región (Morales *et al* 1997b, Morales *et al.*, 2001a, Meléndez *et al.*, 2005).

### 3. Revisión de literatura

#### 3.1 Aspectos históricos

Bjerkas *et al* en 1984 reconocieron una enfermedad parecida a neosporosis en 6 perros Boxer en Noruega, cinco de los cuales desarrollaron alteraciones neurológicas entre los 2 a 6 meses de nacidos. En la histopatología del cerebro y músculo se encontraron estructuras parasitarias semejantes a *Toxoplasma gondii*, sin embargo en el suero de los perros no se encontraron anticuerpos anti-*T. gondii* (Morales *et al.*, 1996).

Antes de que en los Estados Unidos de América (EUA) se identificara al nuevo protozoo que afectaba a los perros al que se le denominó *N. caninum*, algunos investigadores ya sospechaban de que este nuevo género estaba causando abortos en vacas (Morales *et al.*, 1996). Desde 1991, Anderson *et al.*, reconocieron a la neosporosis como una de las principales causas de aborto en California, EUA, sin embargo hasta 1996, Dubey *et al.*, desarrollaron el diagnóstico serológico de neosporosis a través de ELISA en bovinos y perros.

La neosporosis se ha identificado en diversos países alrededor del mundo: Australia, Nueva Zelanda, Corea, Japón y Tailandia y en países de América como Argentina, Brasil, Chile, EUA, Paraguay, Perú, Uruguay y México. El primer informe de aborto bovino asociado a *N. caninum* en México fue realizado por Morales *et al.* (1997) en un feto de bovino Holstein proveniente del Complejo Agroindustrial de Tizayuca estado de Hidalgo (CAIT), el cual presentó lesiones histológicas características y confirmándose la presencia del parásito por inmunohistoquímica (IHQ). Por otro lado, en una encuesta serológica realizada en hatos lecheros mexicanos entre 1997 y 1999, se encontró una seroprevalencia del

72% en vacas pertenecientes a hatos con tasas de aborto epizoótico entre el 13% y 30% anual y del 36% en vacas pertenecientes a hatos con tasas de aborto enzoótico hasta del 12% anual (Morales *et al.* 2001c). En otro estudio histopatológico en 211 fetos abortados en las principales cuencas lecheras del país en el año 2001, se encontraron lesiones características de neosporosis en 73 fetos (35%). Morales *et al.*, (2001d) analizaron los tejidos de 53 fetos con éstas lesiones a los cuales se les practicó un estudio de IHQ utilizando el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa, encontrándose positividad a la presencia de antígenos parasitarios en 41 de los tejidos (78%). En otro estudio serológico realizado con 187 vacas pertenecientes a 13 hatos lecheros del estado de Aguascalientes, se encontró evidencia serológica a *N. caninum* en todos los hatos con una prevalencia del 59%, en donde 76 de 97 vacas seropositivas tenían antecedentes de abortos (García *et al.* 2002). Por otro lado, en un estudio realizado en el CAIT, Hidalgo, México, se determinó y comparó la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* entre perros de establo y de ciudad, así como en vacas de establos con y sin perros y se encontró que la frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* fue significativamente alta en perros de establo (51.85%) con respecto a los de ciudad (20%); y la frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en vacas fue significativamente mayor en establos con perros (58.52%), que sin ellos (35.83%), dichos resultados sugieren la posible transmisión del parásito, de los perros al ganado (Sánchez *et al.*, 2003).



## 3.2 Ciclo Biológico

La neosporosis es una enfermedad parasitaria que afecta a caninos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos y ciervos, causada por el protozooario *N. caninum* (Dubey y Lindsay, 1996). *N. caninum* es un protozooario, parásito intracelular perteneciente a la familia *Sarcocystidae* phylum *Apicomplexa*, estrechamente relacionado con *Toxoplasma* (Stenlund, 2000; Dubey, 2003) En su ciclo de vida, el perro y el coyote son los hospedadores definitivos (Gondim *et al.*, 2004a). Los hospederos intermediarios son los bovinos, ovinos, caprinos, equinos, y búfalos de agua, pero el perro puede comportarse también como hospedero intermedio (Dubey 2003). Los estadios parasitarios reconocidos son: bradizoito, taquizoito, quiste tisular y ooquiste. Mientras los taquizoitos y quistes tisulares se encuentran en hospederos intermediarios, los ooquistes se eliminan en las heces del perro.

En el ciclo de vida se consideran tres fases de importancia (Valenzuela, 2005.); la fase de multiplicación rápida, la fase de multiplicación lenta, y la fase de eliminación.

### 3.2.1 Fase de multiplicación rápida

Durante esta fase, el parásito se encuentra dentro de los hospedadores intermedios y se caracteriza por la formación de taquizoitos, de ubicación intracelular, generalmente presentes a nivel citoplasmático, específicamente en la vacuola parasitófaga de la célula hospedera (Dubey, 2003), midiendo entre 3-7 x 1-5  $\mu\text{m}$ . Se localizan de preferencia en células nerviosas pero puede parasitar a un

gran número de células como macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos y hepatocitos. Los taquizoitos se reproducen de manera asexual por endodiogénesis (dos células hijas se forman dentro del parásito progenitor) tienen entre 6-16 roptrias (organelos apicales con forma de pera involucrados en la invasión de la célula por parte del parásito) y en algunos casos presentan entre 4-6 roptrias localizadas posteriores al núcleo, raramente se observa un microporo, son de forma ovoide, semilunar o globosa (Georgieva *et al.*, 2006).

### **3.2.2 Fase de multiplicación lenta**

Al igual que la fase de multiplicación rápida, esta fase se desarrolla dentro del hospedador intermedio, con una reproducción asexual por endodiogénesis, se favorece la formación de bradizoitos, los cuales pueden permanecer dentro de los quistes tisulares durante años. Miden aproximadamente 7-8  $\mu\text{m}$  (Dubey, 2004), contienen los mismos organelos que el taquizoito, pero presentan un número menor de roptrias. Morfológicamente son muy similares a los taquizoitos. Los quistes se localizan en el sistema nervioso central (SNC), tejidos fetales, incluida la retina (Dubey, 2002), son ovalados o redondos y miden hasta 107  $\mu\text{m}$  de diámetro, dentro de cada uno se encuentran de 50 a 500 bradizoitos, su pared es lisa y gruesa (Dubey, 2004). Estos quistes tisulares son ingeridos por el hospedador definitivo, una vez dentro de él invaden las células del epitelio intestinal y rápidamente se convierten en taquizoitos y se multiplican repetidamente mediante endodiogénesis (Dubey, 2004).

### 3.2.3 Fase de eliminación

Esta fase se desarrolla dentro del hospedero definitivo, después de algunos ciclos de reproducción asexual dentro del epitelio intestinal, comienza dentro de estas mismas células una multiplicación sexual que finaliza con la formación de ooquistes no esporulados, miden de 113 a 117  $\mu\text{m}$  de diámetro, son descargados con la materia fecal y en condiciones ambientales favorables pueden esporular dentro de 24 a 48 h (Lindsay y Dubey, 1999). Una vez que esporulan en el ambiente contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno, morfológicamente son similares a los ooquistes de *T. gondii* y *Hammondia sp.*, en el perro (Dubey, 2002).

La infección en los bovinos se inicia por la ingestión de alimentos y agua contaminados por ooquistes esporulados. En el intestino del animal, los esporozoitos abandonan los ooquistes, invaden las células del epitelio intestinal desde donde se diseminan para invadir y multiplicarse en células de distinto origen embrionario, formando acúmulos de taquizoitos que las destruyen. Estos taquizoitos libres invaden células cercanas y reinician su multiplicación. Sólo en el SNC los taquizoitos se reconvierten en bradizoitos y forman los quistes tisulares. En las vacas gestantes, los taquizoitos se localizan en el útero y la placenta e infectan al feto (infección congénita).

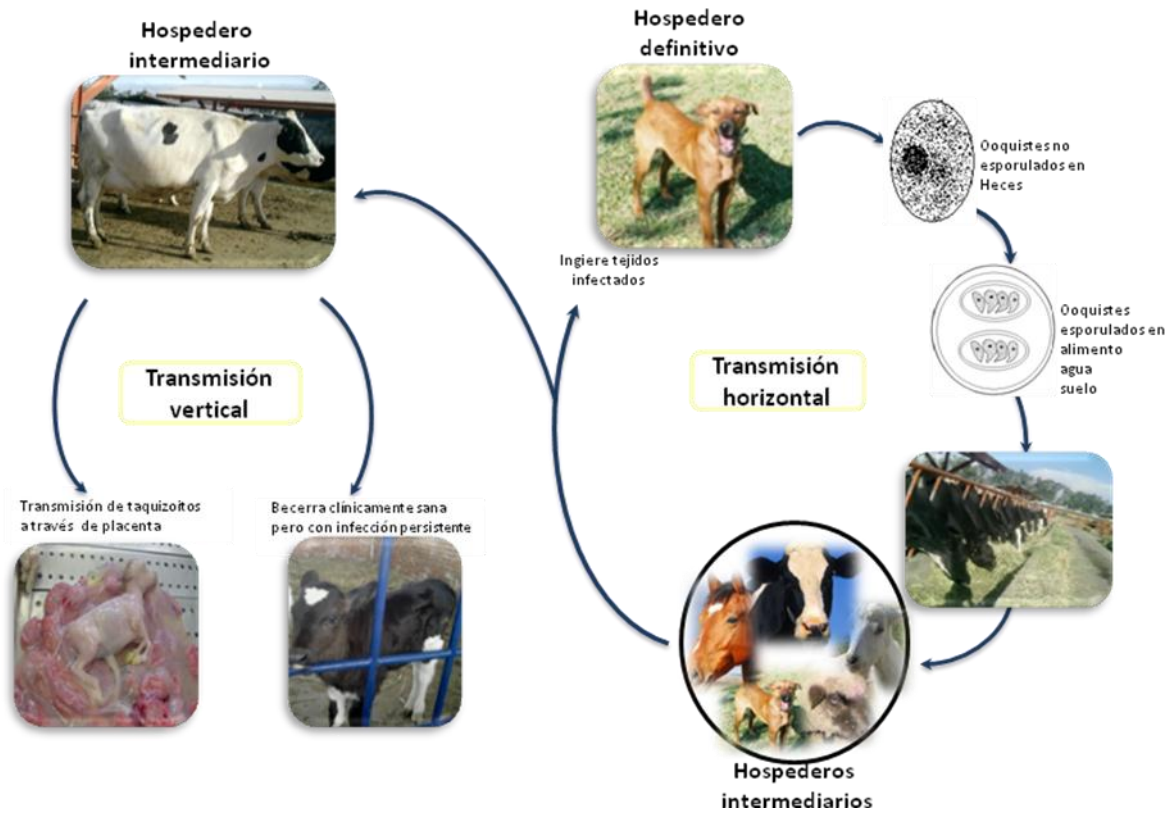


Figura 1. Ciclo de vida de *Neospora caninum*. Adaptado de Dubey 2003.

### 3.3 Patogenia y Transmisión en Bovinos

Hoy en día se ha demostrado que el parásito puede transmitirse por diferentes vías (Fig. 1), siendo la transmisión vertical-transplacentaria el principal mecanismo para mantener la infección en los hatos (Fig. 2). Las rutas naturales de transmisión post-natal de *N. caninum* entre perros y ganado, se da por la ingestión de restos placentarios, fetos muertos o líquidos de las descargas post-parto, por los perros, y se debe evitar que estos animales eliminen sus heces en el alimento y agua del ganado (Dubey *et al.*, 2006).

La manera dominante de las infecciones adquiridas es por transmisión congénita o lactogénica (Reiterova *et al.*, 2009), sin embargo, Dubey., (2006) menciona que la transmisión de taquizoitos por medio de la ruta lactogénica es de poca importancia. La infección postnatal o transmisión horizontal (Fig. 1) se inicia con la ingestión de alimentos y agua contaminados por ooquistes esporulados, una vez liberados en la luz intestinal, los esporozoitos atraviesan la barrera intestinal para llegar a los tejidos vía sistema linfático y sanguíneo. En las células hospederas infectadas, se inicia el proceso de multiplicación rápida pudiendo el parásito ocasionar una necrosis celular e inflamación, ó bien formar quistes tisulares capaces de permanecer durante toda la vida del animal. Los bradizoítos alojados en los quistes tisulares del SNC de una hembra bovina gestante pueden reactivarse bajo ciertas influencias hormonales e inmunológicas, originando una parasitemia (Sawada *et al.*, 2000).

Durante la difusión sanguínea, los taquizoitos atraviesan la placenta pudiendo ocasionar la interrupción de la gestación ó la transmisión vertical con el nacimiento de una cría congénitamente infectada. Se ha propuesto que transcurren de 3 a 4 semanas entre la infección y el aborto (Dubey *et al.*, 2003). La finalización de la gestación puede concluir con el nacimiento de una cría que en el caso de ser hembra, transmitirá la enfermedad a su descendencia, tendrá riesgo de abortar, ó el nacimiento de terneros infectados en el útero con signos neurológicos y bajo peso al nacimiento (Georgieva *et al.*, 2006).

La infección fetal por *N. caninum* no siempre produce muerte del feto, se pueden encontrar terneros vivos afectados congénitamente y con signología muy variable; las lesiones en el SNC pueden producir cuadros clínicos que a menudo se limitan a disfunciones de las extremidades, que van desde leves déficits propioceptivos, ataxia, disminución del reflejo patelar, a parálisis total, pueden presentar también anormalidades como exoftalmia o asimetría ocular (Valenzuela, 2005).

Las vacas afectadas no muestran ningún signo clínico de enfermedad, a excepción del aborto (Dubey *et al.*, 2007). No suele haber retención de placenta y la fertilidad después del aborto no parece verse alterada. *N. caninum* parasita principalmente células del sistema nervioso central, músculo esquelético y cardíaco, células endoteliales y placenta. La multiplicación del parásito por división intracelular destruye las células parasitadas y produce focos de necrosis rodeados de áreas de inflamación no purulenta. Los focos necróticos localizados en músculo y tejido nervioso serían los responsables de la aparición de alteraciones neuromusculares, mientras que en la placentitis, los focos necróticos en los

cotiledones y las lesiones necróticas e inflamatorias en el sistema nervioso central y corazón de los fetos serían las causantes del aborto. Los fetos no presentan alteraciones macroscópicas aparentes, aunque suele haber un grado elevado de autólisis, siendo también muy frecuente la presencia de fetos momificados (Morales *et al.*, 1997). Muchas veces los abortos pasan inadvertidos para el ganadero, que sólo se percató de ello cuando la vaca vuelve a presentar estro y que a veces considera como errores en el diagnóstico de gestación. No se han descrito abortos en vacas con gestaciones menores de 2 meses de gestación, aunque no se puede descartar que puedan producirse muertes embrionarias. Se han descrito abortos por *N. caninum* tanto en vacas de aptitud cárnica como lechera, aunque se dispone de más datos sobre vacunos lecheros; no se piensa que exista predisposición racial, sino que la mayor tasa de abortos en ganado lechero estaría relacionada con el manejo, la mayor densidad de animales en unidades de producción intensivas y la mayor facilidad de que los alimentos se contaminen con heces del hospedador definitivo. Asimismo, es más fácil que los abortos pasen desapercibidos en ganaderías extensivas. *N. caninum* puede provocar abortos repetidos en gestaciones consecutivas o intercalar abortos con gestaciones normales y nacimiento de terneros infectados. Se han registrado casos de vacas seropositivas que han abortado 3 y 4 veces (Dubey, 2005).

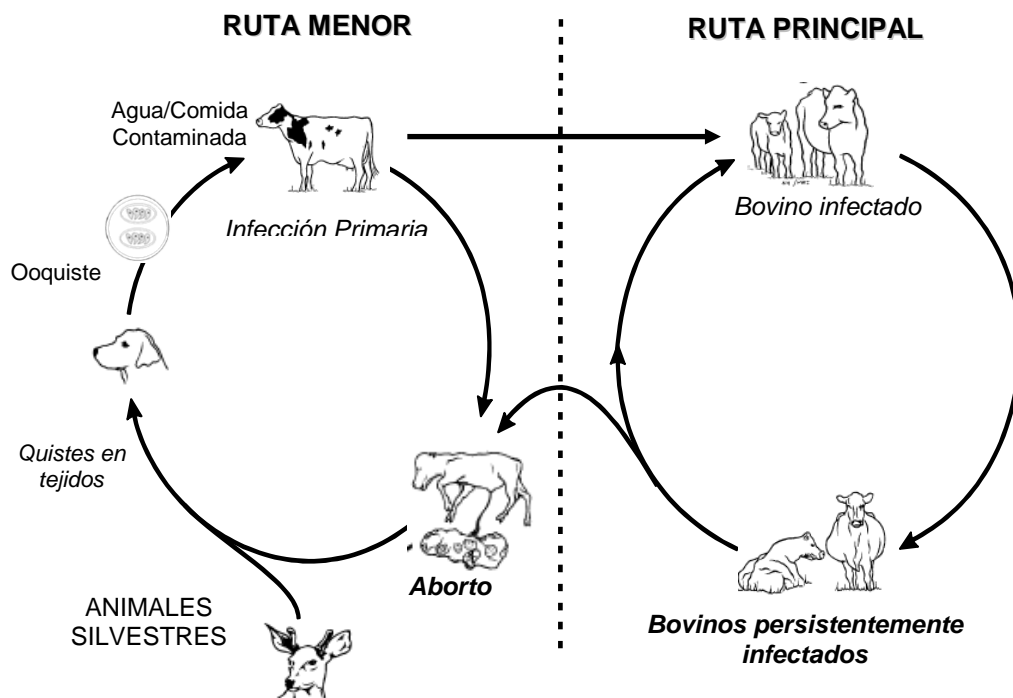


Figura 2. Transmisión de neosporosis bovina. Adaptado de Dubey 2006.



### 3.4 Epidemiología

Meléndez *et al.*, (2005) mencionan que en México se encontró seroprevalencia de 72% en vacas de hatos con tasas anuales de abortos de hasta 30% en los últimos tres años (aborto epizoótico) y de 36% en vacas de hatos con tasas de abortos hasta de 12% anual en los últimos tres años (aborto enzoótico), por lo que se consideró que la enfermedad podría estar ampliamente difundida.

El aborto asociado a *N. caninum* en los hatos puede tener un patrón epizoótico o enzoótico. Existen evidencias de que después de haber transcurrido un brote de aborto epizoótico, el rebaño afectado puede experimentar abortos enzoóticos. Los brotes se definen como epizoóticos si el aborto es temporal, donde el 15% de las vacas en riesgo, abortan en un plazo de cuatro semanas, el 12% de las vacas abortan en un plazo de ocho semanas ó 10% de las vacas abortan en un plazo de seis semanas. En contraste, un problema de aborto es considerado como enzoótico si el aborto se presenta a través de varios meses o años. Es probable que estos dos patrones de abortos asociados a *N. caninum* estén relacionados a dos rutas de infección por las cuales *N. caninum* puede ser la causa de aborto (Fig. 3). Una infección latente en la madre durante la gestación que ocasiona una infección fetal endógena transplacentaria, puede causar aborto. La infección latente en la madre puede adquirirse verticalmente o posnatalmente. El mecanismo de reactivación de la infección latente de *N. caninum* es desconocido. La supresión inmune por la ingestión de alimentos tóxicos u otras infecciones concurrentes puede ser causa de la reactivación, esto se ha discutido pero no se ha demostrado con datos. Recientemente se demostró que la

suplementación de progesterona durante la mitad de la gestación incrementa el riesgo de abortos en vacas lecheras infectadas con *N. caninum* y que presentan títulos altos de anticuerpos (Bech-Sabat *et al.*, 2007).

Independientemente del origen de la infección (exógena o endógena), no todos los fetos se llegan a enfermar congénitamente. Si el aborto epizoótico es causado por exposición de comida o agua contaminados por ooquistes, la variabilidad observada con respecto a riesgo de aborto se puede explicar por factores tales como la dosis de infección, la patogenicidad del parásito, la susceptibilidad de las madres (estado inmunológico, estado de gestación), por los cuales los animales se infectaron (Gondim *et al.*, 2004b).

En hatos con presentación de aborto enzoótico asociado a neosporosis, se asocia el *status* serológico positivo de las madres con el de su progenie, que evidencia que la ruta de transmisión mayoritaria en estos hatos es la vertical (Hall *et al.*, 2005).

En varios estudios se demostró que en la infección crónica de vacas seropositivas puede ser más riesgoso el aborto que en madres seronegativas. El riesgo de aborto se incrementa en vaquillas infectadas congénitamente durante su primera gestación pero no en gestaciones posteriores, comparado con el riesgo de aborto en seronegativas (López-Gatius *et al.*, 2005).

Los abortos epizoóticos pueden ser debidos a una infección primaria en las madres, probablemente por la ingestión de comida o agua contaminada con ooquistes resultando en abortos dentro de un periodo corto de tiempo. Al encontrar una respuesta baja de afinidad de inmunoglobulina G (IgG) sugiere una infección reciente en el hato (Björkman *et al.*, 2006).

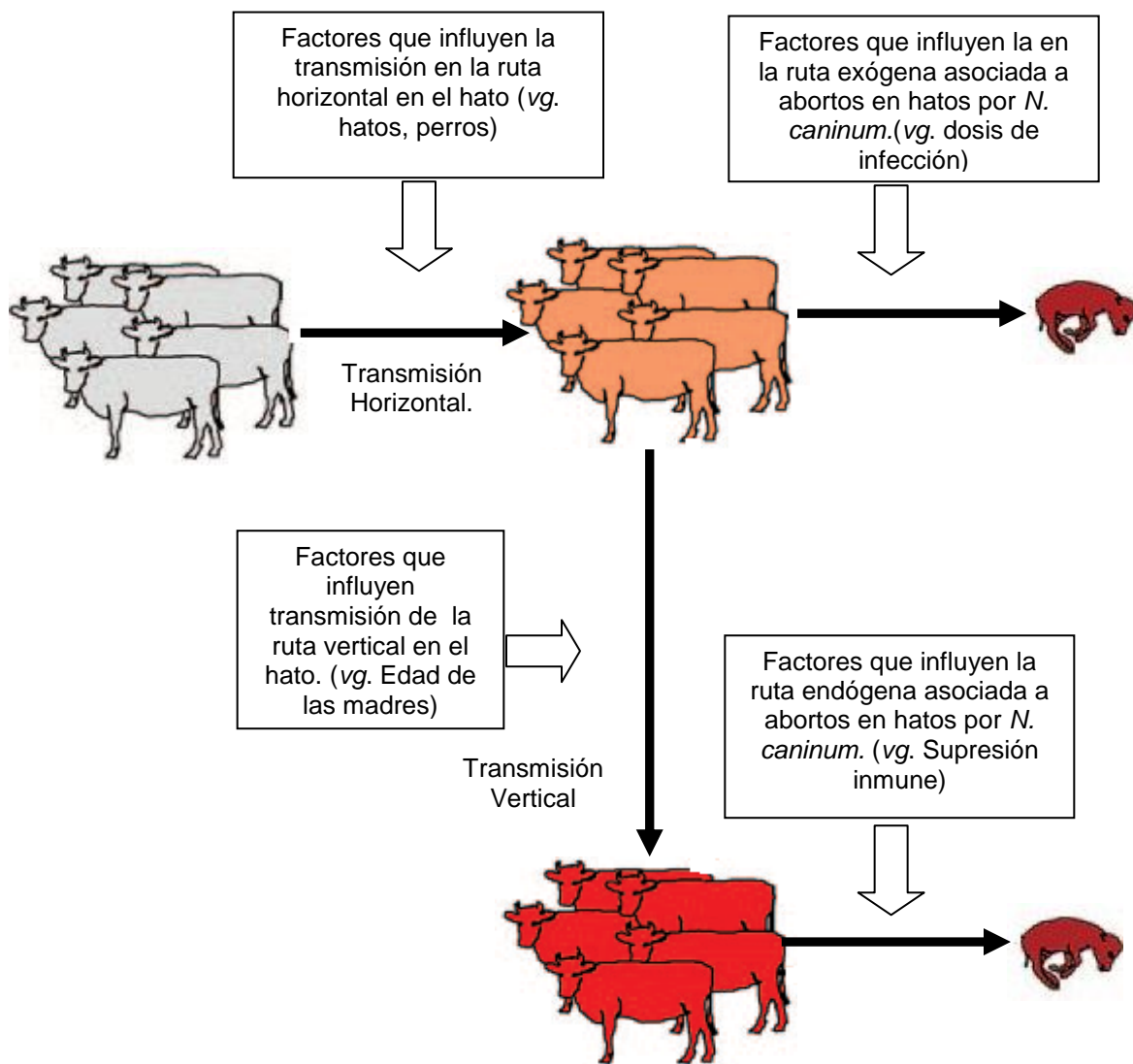


Figura 3. Descripción del riesgo potencial o factores que influyen la transmisión horizontal o vertical de *N. caninum* y la ocurrencia de aborto endógeno o exógeno asociado a *N. caninum*. En este diagrama se ejemplifica el ganado nuevo (color gris), el ganado infectado posnatalmente (color naranja) y en color rojo el ganado infectado verticalmente (Tomado de Dubey *et al.*, 2007).

### 3.5 Respuesta inmune de bovinos frente a *N. caninum*

La preñez está condicionada por factores ambientales externos (infecciones o estrés) que pueden desequilibrar el balance entre madre-producto y ocasionando el aborto. La respuesta inmune Th2 mantiene la preñez mediante la producción de interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 9 (IL-9) e interleucina 10 (IL-10) y la reducción de moléculas pro-inflamatorias como interleucina 12 (IL-12) e interferón gamma (IF- $\gamma$ ).

Uno de los mecanismos más importantes de rechazo del feto involucra un desbalance entre la respuesta Th1/Th2 a favor de la respuesta Th1. Los protozoarios intracelulares como *N. caninum*, estimulan una respuesta inmune Th1 dominada por la producción de IL-12, IF- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF) e inmunoglobulina G<sub>2</sub> (IgG<sub>2</sub>) (Moore *et al.*, 2005). Las infecciones que promueven una respuesta Th1 alteran el sincitiotrofoblasto. Más aun, el IF- $\gamma$  es capaz de actuar directamente sobre este tejido induciendo abortos espontáneos (Moore *et al.*, 2005).

### 3.5.1 Relación parásito-hospedero

Generalmente se acepta que el aborto debido a *N. caninum* es el resultado de la parasitemia materna, seguido de la infección letal del feto o los daños de la placenta. Esto puede ocurrir si la madre se infecta por primera vez con la ingestión de ooquistes de *N. caninum* o con una infección previa en un animal con enfermedad crónica (Innes *et al.*, 2007).

Factores que influenciarán el resultado de esta infección parasitaria son:

- La sincronización de la parasitemia durante la gestación de la vaca (la parasitemia ocurre en la gestación temprana y es mas probable que el feto sea perjudicado).
- La cantidad y la duración de la parasitemia.
- La eficacia de la respuesta inmune materna.
- La habilidad del feto para responder a la infección.

### **3.5.2 Inmunidad mediada por anticuerpos**

Moore *et al.*, 2005 mencionan que las infecciones a partir de taquizoitos u oocistos de *N. caninum* caracterizan la inmunidad mediada por anticuerpos (IMA) y en animales naturalmente infectados la avidéz de IgG tiende a incrementarse con el curso de la infección, permitiendo la identificación de animales crónica o recientemente infectados. Después de la infección, los anticuerpos predominantes son los de isotipo IgG<sub>2</sub> siendo bajos o nulos los niveles de IgG<sub>1</sub>. También hacen mención que en bovinos experimentalmente infectados existe una respuesta dependiente de células cooperadoras Th1 asociadas a la producción de IgG<sub>2</sub>.

### **3.5.3 Inmunidad mediada por células**

En infecciones por protozoos *Apicomplexa*, como en el caso de *N. caninum*, la respuesta inmune relacionada con la protección es principalmente de tipo Th1 con la producción de INF- $\gamma$ , IL-12, y TNF- $\alpha$  y la presencia de células NK (también productoras de INF- $\gamma$ ). Algunas de estas citocinas beneficiosas para intentar controlar la infección, resultan perjudiciales para la unidad feto-placenta, antagonizando con el buen término de la preñez. Los tejidos de unión feto-placenta producen citocinas pro-gestacionales características de la respuesta Th2 (IL-4, IL-5, e IL-10), debido a los altos niveles de progesterona. Esta hormona inhibe la producción de óxido nítrico que tiene actividad microbicida, del TNF- $\alpha$  y la actividad de las células NK (Venturini y Venturini, 2006; Innes, 2007). Por lo tanto, es necesaria una respuesta Th1 dominante para combatir la infección, dando

como resultado la producción de citocinas inflamatorias y perjudiciales para el feto en el inicio de la preñez (Venturini y Venturini. 2006; Innes 2007).

La determinación de la respuesta inmune mediada por células puede realizarse mediante la detección de los niveles de INF- $\gamma$ , o bien indirectamente mediante la detección de IgG<sub>2</sub> producida durante la respuesta inmune celular (Venturini y Venturini, 2006; Innes, 2007).

### 3.6 Diagnóstico

El diagnóstico de la neosporosis se puede realizar tanto en animales vivos, de forma individual, como en una hembra con antecedentes de aborto o de forma integral cuando se pretende determinar el *status* de un hato. En la determinación del *status* serológico de un hato se consideran las características clínicas y epidemiológicas del hato. Los datos reproductivos de interés son la determinación de abortos en los últimos años, la edad y características de los fetos, y si los abortos son de forma enzoótica o epizootica (Anderson *et al.*, 2000). Los datos clínicos y epidemiológicos hacen sospechar la presencia de la infección por *N. caninum* y la posible participación en las interrupciones de la gestación, que aunados a los datos serológicos permiten interpretar el grado de diseminación de la enfermedad y dirigen la elección de medidas preventivas y de control. Sin embargo, el diagnóstico definitivo debe estar basado en el empleo de las técnicas de diagnóstico preciso (Dubey, 2005).

Para establecer el diagnóstico es importante implementar una ruta diagnóstica, utilizando un ensayo serológico, y haciendo la colección de datos para poder establecer si las hembras son seropositivas a *N. caninum* y así demostrar que estuvieron en contacto con el parásito (Fig. 4).



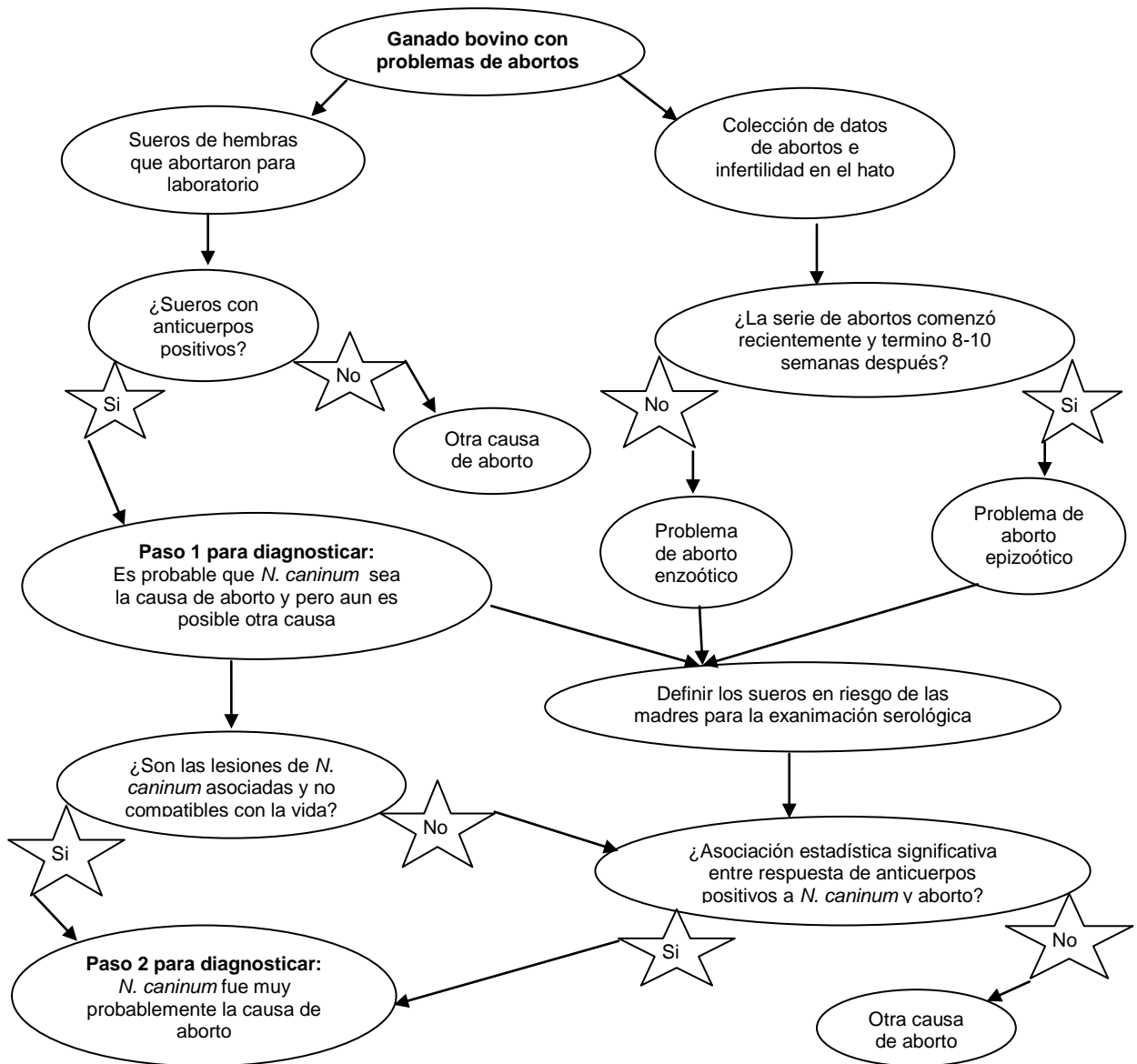


Figura 4. Ruta diagnóstica de *N. caninum*, modificado de Dubey 2006.

Para el diagnóstico de *N. caninum* existen pruebas como el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la aglutinación directa y la electroforesis combinada con transferencia a papel e inmunodetección (*Western blotting*) que son métodos serológicos se basan en la detección de anticuerpos para *N. caninum* (Bjorkman y Ugglá, 1998; Dubey, 2003) y se realizan a partir de sueros de madres sospechosas o a partir de líquido amniótico de fetos abortados (Venturini, 2006). La histopatología, inmunohistoquímica (IHQ) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que se desarrollan en el seguimiento de tejidos de fetos abortados (Dubey, 2005).

Con la histopatología puede establecerse el diagnóstico presuntivo de aborto por *N. caninum* ante la presencia de lesiones como meningoencefalitis necrótica multifocal (MENM), miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía y adrenalitis focales no supurativas caracterizadas por la presencia de células mononucleares. La IHQ ayuda a identificar los parásitos en los tejidos de fetos abortados y debe sumarse a los resultados obtenidos mediante la histopatología. Esta es una prueba muy laboriosa y su sensibilidad es relativa. Se deben examinar cortes de 3 a 5 áreas del cerebro y de otros tejidos. El hallazgo de algún quiste o acúmulo de taquizoitos, define una infección congénita, pero no la causa del aborto. El reconocimiento de los taquizoitos en los órganos lesionados y la eliminación de otras causas de abortos, asociando la utilización de varias pruebas de diagnóstico permitirán, relacionar a *N. caninum* como agente causal del aborto (Dubey *et al.*, 2006).

La PCR, es una técnica de alta sensibilidad y especificidad, aunque su uso no está tan extendido para el diagnóstico como en la investigación. La prueba de

PCR es un auxiliar valioso para la detección de *N. caninum* en tejidos infectados y el impacto en el diagnóstico ha sido notable, permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos (Dubey, 2003). Debido a la alta eficiencia que tiene *N. caninum* para transmitirse en forma vertical, los resultados positivos por IHQ o PCR deberán estar siempre asociados a problemas reproductivos y a la utilización de otras técnicas diagnósticas, no sólo para identificar dicho parásito sino también para descartar otras causas de aborto (Dubey, 2003).

Las pruebas serológicas tienen una importante aplicación en la detección de ganado infectado y permiten identificar a animales portadores del parásito y así saber cuales se deben eliminar, o también determinar si hembras de reemplazo son portadoras de *N. caninum* y de esta manera poder evitar la introducción de la infección al hato (Hall *et al.*, 2005).

Un diagnóstico definitivo puede lograrse cuando el problema es examinado incluyendo todos los integrantes del hato en situación de riesgo, por lo tanto se examina todo el hato; la razón es determinar por métodos estadísticos si la proporción de seropositividad es mas alta en las vacas abortadas, que en vacas que no abortaron es decir para determinar si el aborto se asocia a seropositividad contra *N. caninum*. Cabe destacar que solo los resultados serológicos que se han obtenido a partir de hembras en riesgo (es decir las hembras gestantes durante el periodo de tiempo en que ocurrió el aborto); en casos enzoóticos el periodo en el cual las hembras gestantes tienen riesgo de aborto y pueden durar varios meses hasta el año, mientras que en la epizootia puede durar solo unas pocas semanas. Los animales que debido a la neosporosis abortan, tienen a menudo mas niveles

de anticuerpos específicos de *N. caninum* que las madres que no abortan (Quintanilla-Gózalo, *et al.*, 2000).

Las pruebas serológicas tienen la ventaja de que pueden aplicarse *ante-mortem* y puede proporcionar la información en la etapa de la infección. En terneros o ganado adulto pocos días después de la infección primaria, aparecen los anticuerpos específicos IgM e IgG. El pico más alto ocurre después de dos semanas de la infección y declina debajo del límite de detección en la prueba de aglutinación de *N. caninum*, pero en cuatro semanas de infección otra vez el nivel de IgG incrementa progresivamente, hasta los 3-6 meses después de la infección experimental primaria. Después de que los taquizoitos o los ooquistes inducen la infección primaria, el levantamiento inicial específico de IgG<sub>1</sub> es seguida por una leve oleada retrasada de IgG<sub>2</sub>. El nivel específico de anticuerpos puede persistir de por vida, pero fluctuar y algunas veces estar por debajo del límite de detección de la prueba serológica. Después de la infección primaria, la presencia de anticuerpos específicos contra *N. caninum* aumenta con el tiempo y esto puede dar hasta cierto punto información sobre la duración de una infección primaria (Dubey *et al.*, 2006).

Varias pruebas se han desarrollado para diferenciar niveles bajos de respuesta de IgG (que indican una infección primaria reciente de 2 meses de duración aproximada) de una respuesta alta de IgG (que indican una infección crónica). Por lo general, una respuesta alta de IgG, se observa en el ganado infectado de forma naturalmente con más de 6 meses. En estudios de campo la respuesta baja de IgG podría asociarse a infección epidémica relacionada a *N.*

*caninum*, lo que sugiere que una infección primaria reciente como la causa del aborto (Dubey *et al.*, 2006).

Se ha reconocido que la técnica de ELISA es consistente, objetiva, rápida, precisa y proporciona alta sensibilidad y especificidad, siendo más práctica respecto del número de muestras que se pueden analizar en comparación con la prueba de fluorescencia indirecta de anticuerpos IFAT (Meléndez *et al.*, 2005). El ELISA puede medir la presencia de IgG específica de *N. caninum* y es capaz de encontrar indicios de una infección reciente en un hato, sin embargo la prueba en algunos casos concretos se debe hacer con cuidado porque cada animal puede mantener una baja respuesta de anticuerpos a pesar de ser animales infectados por varios años (Björkman, *et al.*, 2003).

Los ensayos serológicos se basan principalmente en la utilización de antígenos de taquizoitos, y aún no están disponibles los ensayos basados en antígenos de bradizoitos o esporozoítos (Dubey, *et al.*, 2006).

Después de la ocurrencia de aborto o mortalidad neonatal en un hato, un examen serológico de las hembras afectadas pueden proporcionar información, si están infectadas con *N. caninum* y, de ser así han tenido una infección reciente o han tenido una infección crónica. La mayoría de las vacas han infectado un feto de *N. caninum* de modo que son positivas en el momento de aborto, en consecuencia un resultado serológico negativo para la hembra es poco probable que *N. caninum* haya participado en el aborto, muerte fetal o mortalidad neonatal; en algunos casos, sin embargo, fetos abortados o terneros positivos nacidos de madres seronegativas, esto puede ser debido a la fluctuación en los niveles de anticuerpos (Sager, *et al.*, 2001). Los niveles de anticuerpos pueden descender por debajo del

límite de detección de pruebas menos sensibles y causar resultados falsos negativos. La presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en el suero de una hembra permite un diagnóstico no definitivo ya que solo una baja proporción de madres abortarán y la mayoría de sus crías nacerán infectadas pero sanas (Guy, *et al.*, 2001)

La prueba serológica de ELISA es potencialmente importante para apoyar el mantenimiento de los hatos ya sea libres de infecciones causadas por *N. caninum* o bien para identificar si están infectados nuevamente (Chanlun *et al.*, 2006). La identificación de la transmisión vertical como la vía de transmisión predominante fue en gran medida sobre la base de los resultados serológicos. Los estudios seroepidemiológicos permiten generar datos sobre la importancia de *N. caninum* como un agente abortivo, su efecto sobre los parámetros productivos como la reducción de la producción de leche y eliminación prematura del feto (Waldner, 2002).

La reactivación de la infección crónica como un supuesto factor responsable de la transmisión vertical, es cuando hay aumento en los niveles de anticuerpos específicos durante la gestación. Una respuesta serológica a *N. caninum* durante la preñez puede ayudar a predecir el aborto en la transmisión vertical en madres crónicamente infectadas (Dubey *et al.*, 2006). En México actualmente se utiliza para el diagnóstico la prueba de ELISA, que tiene la capacidad de detectar anticuerpos, producto de la infección del parásito, pero con el inconveniente de que no todo animal que es positivo a la prueba necesariamente abortará o ha abortado como consecuencia de la infestación por *N. caninum*. Sin embargo, es una ayuda muy importante cuando se analizan los resultados serológicos de un

número plural de animales dentro de un hato y se comparan con los obtenidos para otras enfermedades. La detección de anticuerpos específicos en el suero de la vaca es solamente indicativa de la exposición a *N. caninum* y no es de diagnóstico por sí mismo (Dubey, 2005). Frecuentemente, los resultados que sugieren la neosporosis como causa de aborto, cobran solidez cuando no hay indicios de la acción de otra enfermedad abortiva. Es importante analizar la extensión de las lesiones y su incompatibilidad con la vida del feto. Ello se debe al elevado porcentaje de infecciones congénitas en animales nacidos clínicamente normales. Otros protozoarios que pueden causar lesiones semejantes son *T. gondii* y *Sarcocystis spp.* (Morales *et al.*, 1997). Sin embargo, estos son de hallazgo poco frecuente y el primero no es considerado abortivo en bovinos.

## 4. Justificación

El estado de Hidalgo ocupa el quinto lugar en producción lechera a nivel nacional (SIAP 2010), dicha producción se concentra principalmente en: Complejo Agroindustrial de Tizayuca estado de Hidalgo, así como Valle del Mezquital y del Valle de Tulancingo, quienes aportan más del 90% de la producción de leche. De acuerdo a la SAGARPA (2006) el ganado bovino lechero se clasifica en: especializado, semiespecializado y de traspatio (SAGARPA, 2005), éste último forma uno de los sistemas más importantes de producción para los pequeños productores del estado de Hidalgo.

Los problemas que afectan la salud reproductiva en el ganado lechero son causados por múltiples etiologías. El VDVB, VHB-1), agente causal de la rinotraqueítis infecciosa bovina, bacterias como *Brucella sp.* y *Leptospira sp.* y el parásito *N. caninum*. Debido a que la infección por *N. caninum* causa un impacto económico en hatos lecheros debido a la baja en la producción lechera y los problemas reproductivos e infertilidad, abortos, muerte embrionaria, malformaciones congénitas, neonatos nacidos débiles, o neonatos nacidos en un estado clínico aparentemente sanos, sin embargo si se trata de animales de reemplazo se convierten en transmisores de la enfermedad.

La prueba serológica de ELISA permite detectar la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* lo que nos indica si el hato es seronegativo o seropositivo, en este último caso los abortos o problemas de infertilidad podrían estar asociados a infecciones con *N. caninum*. La mayoría de los estudios de seroprevalencia de este parásito en México y el estado de Hidalgo se han realizado en hatos



especializados o semiespecializados y poco se sabe del ganado lechero de traspatio.

Por lo que en el presente trabajo se determinó el estatus de reactividad serológica a *N. caninum* en el ganado lechero de traspatio en el estado de Hidalgo.

En el presente trabajo se estableció el estatus serológico con respecto a la infección causada por *N. caninum* en el ganado lechero de traspatio ya que éste forma uno de los más importantes sistemas de producción generadores de recursos para los pequeños productores en el Estado de Hidalgo.

## 5. Objetivos

### 5.1 General

- Determinar la frecuencia de anticuerpos contra *N. caninum* en bovinos de traspatio del estado de Hidalgo.

### 5.2 Objetivos particulares

- Estandarizar la técnica de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* en sueros de bovinos.
- Obtener muestras de suero de vacas en etapa reproductiva de las principales regiones lecheras del estado de Hidalgo.
- Evaluar la presencia de anticuerpos anti *N. caninum* por medio de la técnica de ELISA indirecta en sueros de bovinos de traspatio de las principales regiones lecheras del estado de Hidalgo.

## **6. Material y métodos**

### **6.1 Selección de muestras**

El trabajo se realizó en el estado de Hidalgo (Fig. 5) donde se muestrearon aleatoriamente bovinos de traspatio procedentes del sur del Estado, de las regiones del Valle del Mezquital, Valle de Tulancingo, Altiplanicie Pulquera y Comarca Minera (cuadro 1). Las coordenadas geográficas extremas del Estado son al norte 21°24', al sur 19°36' de latitud norte; al este 97°58', al oeste 99°53' de longitud oeste. El estado de Hidalgo, se localiza en la zona Centro de la República Mexicana, Hidalgo colinda al Norte con Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz; al Este con Veracruz y Puebla; al Sur con Puebla, Tlaxcala y México; al Oeste con México y Querétaro (INEGI 2000).

<b>Cuadro 1. Distribución de los municipios muestreados por región ecogeográfica.</b>	
<b>No. de mpo.</b>	<b>Región/Municipio</b>
	<b>VALLE DEL MEZQUITAL</b>
1	Actopan
2	Chilcuautla
3	Fco. I Madero
4	Ixmiquilpan
5	Mixquiahuala de Juárez
6	Nopala de Villagrán
7	Progreso de Obregón
8	San Agustín Tlaxiaca
9	San Salvador
10	Tepeji del Rio de Ocampo
11	Tepetitlán
12	Tezontepec de Aldama
13	Tula de Allende
	<b>VALLE DE TULANCINGO</b>
14	Acatlan
15	Acaxochitlán
16	Cuautepec de Hinojosa
17	Metepec
18	Tulancingo de Bravo
	<b>ALTIPLANO PULQUERO Y COMARCA MINERA</b>
19	Zempoala
20	Pachuca de Soto
21	Mineral de la Reforma



Figura 5. Mapa del estado de Hidalgo en el que se muestran geográficamente los municipios muestreados.

## 6.2 Toma de muestras

Se evaluaron 362 sueros sanguíneos de hembras gestantes mayores de 2 años de edad, propiedad de pequeños productores con aproximadamente 30 animales considerados de traspatio (bovino de leche familiar). Para la colección de suero se tomó sangre de la vena coccígea ó yugular, en tubos vacutainer con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se transportó a una temperatura de -2 a -4 grados centígrados al Laboratorio de Histología e Histopatología del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, (Instituto de Ciencias Agropecuarias-Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo) en Tulancingo de Bravo, Hidalgo. Las muestras se centrifugaron a 1000 x *g* durante 15 minutos para la obtención de suero, el cual se depositó en tubos para microcentrífuga (Eppendorf) de 1.7 ml y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

## 6.3 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* en los 362 sueros del ganado bovino muestreados se utilizaron cuatro placas de un *kit* de ELISA indirecta comercial (HerdChek<sup>MR</sup>, Lab. IDEXX) con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 98.9% (Sánchez *et al.*, 2003) El fundamento de la prueba se basa en una microtitulación en placas de 96 pozos para ELISA. La placa de 96 pozos se encuentra recubierta con antígenos de *N. caninum* (macerado de taquizoitos). Al incubar la muestra de prueba (muestra de bovino) en el pozo recubierto con antígenos de taquizoito, el anticuerpo anti-*N. caninum* forma un complejo con los antígenos recubiertos. Después de lavar los pozos para eliminar

el material no ligado, se añadió un conjugado anti-bovino con peroxidasa de rábano, que se une a los anticuerpos bovinos ligados a los pozos. En el paso final del ensayo, se eliminó el conjugado no ligado con un lavado y se añade a los pozos un sustrato de enzima (peróxido de hidrógeno) y un cromógeno tetrametilbencidina 3, 3', 5, 5' (Fig. 6). El color que aparece es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

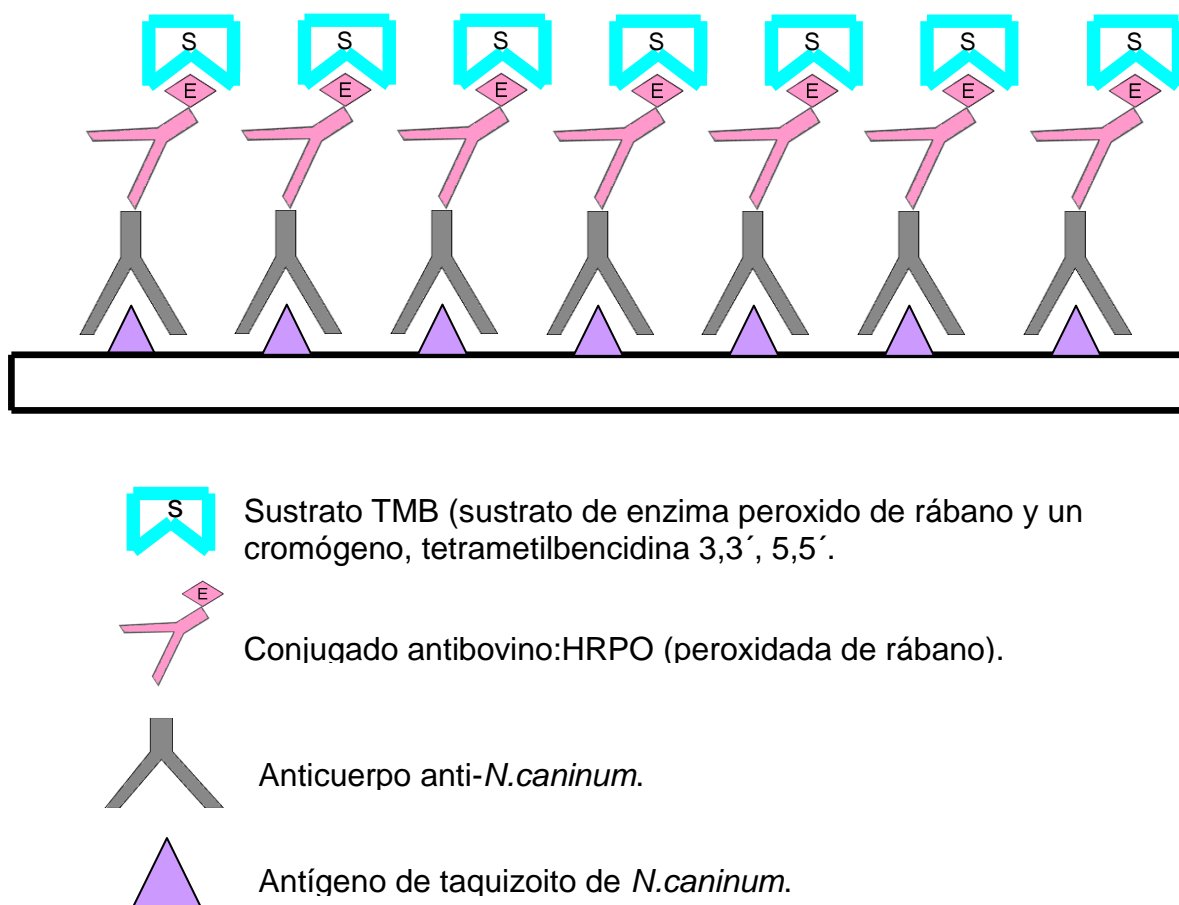


Figura 6. Fundamento de la prueba de ELISA para determinar la seropositividad frente a *N. caninum*.

## 6.4 Procedimiento

Para la realización de la prueba de ELISA, las muestras se evaluaron por pares, para lo cual se diluyeron en proporción 1:100 antes de agregarse a los pozos. Del mismo modo se utilizó un control positivo de *N. caninum* Anti-*N. caninum* bovino en amortiguador con estabilizadores proteicos y un control negativo de *N. caninum* que es un suero no reactivo frente a *N. caninum* en amortiguador de fosfato con estabilizadores proteicos y con azida de sodio como conservador.

El *kit* para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* contiene dos placas recubiertas con antígeno de *N. caninum*, conjugado anti-bovino-HRPO, un control positivo de *N. caninum* Anti-*N. caninum* bovino, un control negativo de *N. caninum*, diluyente para la muestra, concentrado para lavado (fosfato/tween 10X5), Substrato TMB y Solución de paro (Fig. 7).

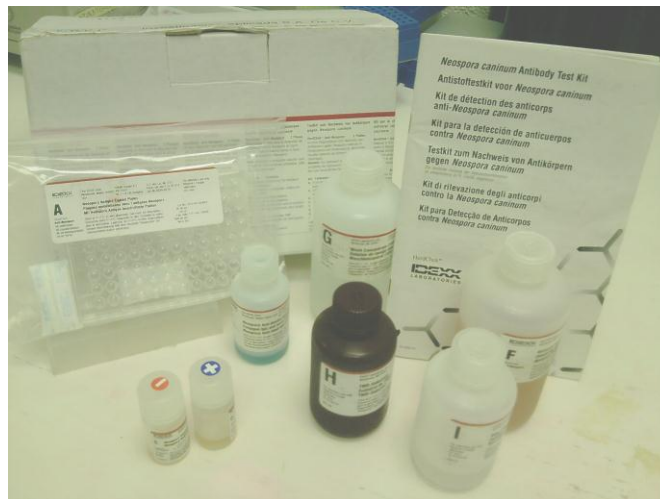


Figura 7. Reactivos que conforman el *kit* HerdChek de los laboratorios IDEXX para la detección de anticuerpos contra *N. caninum*.

Se agregaron 100µl de las muestras de bovino, del control positivo y negativo por pares en la placa de microtitulación. Se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, transcurrido ese tiempo se decantó el líquido y posteriormente se lavó cada pozo 4 veces con 300 µl de solución de lavado. Se añadieron 100µl del conjugado antibovino con HRPO en cada pozo y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez concluido ese tiempo se aspiró todo el líquido y se desechó para después continuar con cuatro lavados a cada pozo. Posteriormente se añadieron 100 µl de solución de sustrato de TMB en cada pozo y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente, hasta que virara el color del control positivo utilizado como referencia. Se adicionaron 100 µl de solución de paro para detener la reacción y la lectura de la absorbancia se realizó a 630 nm. En el equipo de ELISA (marca Awareness Technology mod. Stat Fax 2100, fig. 8). Los resultados se registraron y se imprimieron.



Figura 8.- Equipo de ELISA



## 6.5 Evaluación de resultados

### 6.5.1 Validación de la prueba de ELISA

Para la validación del ensayo sobre los valores de absorbancia (A) obtenidos, la diferencia (P-N) entre el promedio del control positivo (PCx) y el promedio del control negativo (NCx) tiene que ser mayor o igual a 0.150 de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Además, el NCx debe ser menor o igual que 0.2. Para los cálculos se utilizaron las siguientes formulas:

1.- Cálculo del promedio del control negativo (NCx):

$$NCx = \frac{A1 A(650) + A2 A(650)}{2}$$

2.- Cálculo del promedio del control positivo (PCx):

$$PCx = \frac{A3 A(650) + A4 A(650)}{2}$$

### 6.5.2 Interpretación de resultados

La presencia o ausencia de anticuerpos contra *N. caninum* se determinó calculando el cociente de la muestra con respecto al control positivo (S/P) para cada muestra. El control positivo se normalizó y representó una cantidad considerable de anticuerpo contra *N. caninum* en suero bovino.

1.- Cálculo del cociente (S/P)

$$S/P = \frac{\text{valor de absorbância de la muestra} - NCx}{PCx - NCx}$$

Las muestras de suero con cocientes S/P menores que 0.50 se clasificaron como **negativas** hacia los anticuerpos contra *N. caninum*. Cuando el cociente S/P fue mayor o igual que 0.50, las muestras se consideraron como **positivas** hacia los anticuerpos contra *N. caninum* (de acuerdo a las recomendaciones del proveedor).

Una vez que se calculó el valor S/P de las muestras analizadas (362 muestras) se elaboraron los cuadros A1, A2, A3 y A4 donde se concentran los datos de la siguiente manera: Número total de muestras obtenidas de cada municipio, nombre del municipio, valores de densidad óptica obtenidos a una absorbancia de 630nm, las muestras que fueron positivas (P) o negativas (N).y el resultado de S/P. Anexo.

De la información recopilada en estos cuadros se procedió a determinar las frecuencias de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos localizados en las diferentes regiones estudiadas del sur del estado de Hidalgo, México, así como también el análisis de *Chi* cuadrada ( $X^2$ ), es decir, determinar las diferencias entre las regiones y del mismo modo establecer la diferencia entre los municipios de cada región.

### 6.5.3 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante la utilización del estadístico de la prueba de *Chi* cuadrada ( $\chi^2$ ), utilizando el procedimiento (PROC FREQ), del paquete Statistical Analysis System (SAS, 1998), para comparar las frecuencias de anticuerpos contra *Neospora caninum*, entre las diferentes regiones y municipios correspondientes.

## 7. Resultados

Los cálculos de los valores de absorbancia de los controles positivos y negativos utilizados en las cuatro placas de ELISA para determinar la validez de la prueba se muestran a continuación:

Calculo del promedio del control negativo (NCX)

PLACA 1:

$$NCX = (0.270 + 0.268) / 2$$

$$NCX = 0.269$$

PLACA 2:

$$NCX = (0.279 + 0.276) / 2$$

$$NCX = 0.277$$

PLACA 3:

$$NCX = (0.297 + 0.284) / 2$$

$$NCX = 0.290$$

PLACA 4:

$$NCX = (0.280 + 0.282) / 2$$

$$NCX = 0.281$$

Calculo para el promedio del control positivo (PCX)

PLACA 1:

$$PCX = (0.638 + 0.693) / 2$$

$$PCX = 0.6655$$

PLACA 2:

$$PCX = (0.723 + 0.803) / 2$$

$$PCX = 0.763$$

PLACA 3:

$$PCX = (1.181 + 1.198) / 2$$

$$PCX = 1.190$$

PLACA 4:

$$PCX = (1.323 + 1.14) / 2$$

$$PCX = 1.231$$

Calculo del cociente S/P

Ejemplo:

N=	No. De vaca	Mpo.	Densidad óptica (O.D.)
1	129	Actopan	1.074

$$S/P=(1.074-0.269)/(0.665-0.269)$$

$$SP/= 2.030$$

Mediante la prueba de ELISA indirecta aplicada a los bovinos localizados en las diferentes regiones del sur del estado de Hidalgo, México (cuadro 2), se determinó una frecuencia de anticuerpos del 58.01%, no encontrándose diferencias entre las diferentes regiones (P=0.4623).

Lote	Muestras		Negativas		Positivas	
	N	%	N	%	N	%
Valle del Mezquital	255	70.44	102	40.00	153	60.00
Valle de Tulancingo	95	26.24	45	47.37	50	52.63
Altiplano pulquero y Comarca minera	12	3.31	5	41.67	7	58.33
<b>Total</b>	<b>362</b>	<b>100</b>	<b>152</b>	<b>41.99</b>	<b>210</b>	<b>58.01</b>

En la prueba ELISA indirecta dentro de cada municipio del Valle del Mezquital, (cuadro 3), se determinó una frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* igual al 60%. Existiendo diferencias entre los municipios ( $P = 0.0033$ ). Los municipios de Actopan, Fco. Madero, Nopala, San Salvador y Tezontepec en conjunto presentaron la mayor frecuencia, siendo esta del 73.48%, comportándose de manera similar entre ellos ( $P = 0.8823$ ). Los municipios de Ixmiquilpan, Tepeji del Rio y Tepetitlán, presentaron una frecuencia de 38.84%, teniendo un comportamiento similar entre ellos ( $P = 0.4679$ ). Los restantes municipios no se consideraron por el bajo número de observaciones.

Cuadro 3.- Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en el Valle del Mezquital, estado de Hidalgo, México.

Municipio	Muestras		Negativas		Positivas	
	N	%	N	%	N	%
Actopan	13	5.10	3	23.08	10	76.92
Chilcuautla	3	1.18	2	66.67	1	33.33
Francisco I Madero	42	16.47	10	23.81	32	76.19
Ixmiquilpan	75	17.65	40	53.33	35	46.67
Mixquiahuala	2	0.78	1	50.00	1	50.00
Nopala	41	16.08	12	29.27	29	70.73
Progreso	2	0.78	0	0.0	2	100.00
San Agustín Tlaxiaca	5	1.96	4	80.00	1	20.00
San Salvador	25	9.80	8	32.00	17	68.00
Tepeji del Rio	17	6.67	11	64.71	6	35.29
Tepetitlán	17	6.67	7	41.18	10	58.82
Tezontepec	11	4.31	2	18.18	9	81.82
Tula	2	0.78	2	100	0	0
<b>Total</b>	<b>255</b>	<b>100</b>	<b>102</b>	<b>40.00</b>	<b>153</b>	<b>60.00</b>

Sensibilidad = Probabilidad de positivos dentro del grupo de positivos.

Especificidad = Probabilidad de negativos en el grupo negativo.

En la prueba ELISA indirecta aplicada a los bovinos de cada municipio del Valle de Tulancingo de Bravo (cuadro 4), se determinó una frecuencia contra *Neospora caninum* igual a 52.63%, no existiendo diferencias entre los municipios ( $P = 0.1273$ ). Es importante señalar que los municipios de Acaxochitlán y Tulancingo de Bravo fueron negativos a la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*, pero el número de sueros fue muy bajo. Al comparar exclusivamente a los municipios de Acatlán, Cuauhtepic de Hinojosa y Metepec, se utilizaron un total de 89 sueros de bovino en donde se presentó una frecuencia del 56.18% con un valor de  $P = 0.9741$ .

Cuadro 4.- Frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en el Valle Tulancingo de Bravo, estado de Hidalgo, México.

Municipio	Muestras		Negativas		Positivas	
	N	%	N	%	N	%
Acatlán	49	51.58	22	44.90	27	55.10
Acoxochitlán	1	1.05	1	100	0	0.00
Cuauhtepic de Hinojosa	14	14.74	6	42.86	8	57.14
Metepec	26	27.37	11	42.31	15	57.69
Tulancingo de Bravo	5	5.26	5	100	0	0.00
<b>Total</b>	<b>95</b>	<b>100</b>	<b>45</b>	<b>47.37</b>	<b>50</b>	<b>52.63</b>

Sensibilidad = Probabilidad de positivos dentro del grupo de positivos.

Especificidad = Probabilidad de negativos en el grupo negativo.

En la prueba ELISA indirecta dentro de cada municipio del Altiplano Pulquero y Comarca Minera (Cuadro 5), en donde se determinó una frecuencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* igual a 58.33%, no existiendo diferencias entre los municipios ( $P = 0.4244$ ). Es importante resaltar que el número de sueros analizados fue muy bajo ( $n=12$ ).

Municipio	Muestras		Negativas		Positivas	
	N	%	N	%	N	%
Zempoala	8	66.67	4	50.00	4	50.00
Pachuca	2	16.67	1	50.00	1	50.00
Mineral de la reforma	2	16.67	0	0	2	100
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>100.00</b>	<b>5</b>	<b>41.67</b>	<b>7</b>	<b>58.33</b>

Sensibilidad = Probabilidad de positivos dentro del grupo de positivos.

Especificidad = Probabilidad de negativos en el grupo negativo.



## 8. Discusión

Los datos obtenidos en la presente investigación mostraron una frecuencia de anticuerpos contra *N. caninum* del 58.01% del total de muestras colectadas (n=362) en las regiones del sur del estado de Hidalgo, México, que corresponden a hembras gestantes  $\geq$  a dos años consideradas de traspatio (bovino de leche familiar). La región del Valle del Mezquital presentó una frecuencia de 60% (n=255), el Valle de Tulancingo 52.63% (n=95) y el Altiplano Pulquero y Comarca Minera 58.33% (n=12), no encontrándose diferencias entre las regiones (P=0.4623). Los valores obtenidos muestran una amplia distribución de *N. caninum* en las regiones del sur del estado de Hidalgo, lo que debe de impactar significativamente a la economía de la región ya que la ganadería y sobre todo de traspatio se encuentra dentro de la segunda actividad económica del Estado.

Los valores de frecuencia en las diferentes regiones del sur del estado de Hidalgo son semejantes a los reportados por Morales *et al.*, en el 2001, donde determinó una seroprevalencia del 56% (n=1003). Dentro del mismo estudio se evaluó la seroprevalencia de hatos especializados como el Complejo Industrial de Tizayuca Hidalgo, México (CAITSA) y se encontraron valores del 72% (n=182). Se ha descrito que la mayor tasa de abortos en ganado lechero está relacionada con el manejo, la mayor densidad de animales en unidades de producción intensivas y la mayor facilidad de que los alimentos se contaminen con heces del hospedador definitivo. En el traspatio la densidad del hospedador definitivo puede ser una causa de los altos valores de seropositividad. Un estudio realizado en el CAIT, Hidalgo, México, donde se determinó y comparó la presencia de anticuerpos anti-

*N. caninum* entre perros de establo y de ciudad, así como en vacas de establos con y sin perros, se encontró que la frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* fue significativamente alta en perros de establo (51.85%) con respecto a los de ciudad (20%); y la frecuencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en vacas fue significativamente mayor en establos con perros (58.52%), que sin ellos (35.83%), algo que pudiera ser semejante en el traspatio (Sánchez *et al.*, 2003).

Gutiérrez *et al.*, (2007) al evaluar 8 de los 11 municipios del estado de Aguascalientes determinaron una seroprevalencia del 57.5%, semejante a este trabajo. Por otro lado, Meléndez *et al.*, (2005), realizaron estudios sobre la seroprevalencia de anticuerpos contra *N. caninum*, en 591 muestras de hatos bovinos lecheros y de carne del noreste de México (Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas) y revelaron una frecuencia del 36%, estos valores bajos probablemente porque influye en ganado de carne el que generalmente son mantenidos en extensivo, lo que limita el ciclo biológico del parásito. Esta comparación entre ganado de leche y carne también la observan García-Vázquez *et al.*, (2005), quienes evaluaron 20 hatos lecheros de Coahuila, Chihuahua, Hidalgo, Querétaro y Jalisco, estimando una seroprevalencia del 42%, y posteriormente García- Vázquez y *et al.* (2009) hacen un estudio dirigido al sur de la Republica Mexicana (Chiapas, Yucatán y Veracruz) donde encuentran una seroprevalencia del 11.6% de un total de 596 muestras provenientes de ganado de carne.

Los valores de serología permiten establecer el *status* de la enfermedad en una región, aunque se sabe que no todos los animales seropositivos a *N. caninum* presentarán aborto, existe un riesgo mayor para una vaca seropositiva. En

general, se ha determinado que los animales seropositivos a *N. caninum* tienen de 3 a 4 veces mayor posibilidad de abortar que los animales seronegativos (Paré *et al.*, 1997; Moen *et al.*, 1998; y Corbellini *et al.*, 2002). Por otro lado, al establecer el riesgo epidemiológico en una región mediante la observación de frecuencias elevadas de anticuerpos anti-*N. caninum* permite predecir que se transmitirá verticalmente la infección a la progenie si no se establecen las medidas de control en los hatos (Bergeron *et al.*, 2000). El dato predictivo de un significativo índice de transmisión vertical de *N. caninum*, conduce a la recomendación de dar seguimiento a las vacas dentro de una unidad de producción, aún de traspatio, para la identificación de animales seropositivos y así poder reducir el número de animales infectados y las repercusiones sobre sus crías. Sin embargo, si existe una alta incidencia, el desecho de todos los animales infectados dentro de un período de tiempo corto no es una manera práctica de eliminar a *N. caninum* en el traspatio. Lo que genera la necesidad de desarrollar estrategias óptimas para reducir o limitar las infecciones por este parásito.

## 9. Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran una frecuencia de anticuerpos anti *N. caninum* del 58.01% (n=362), lo que demuestra una distribución amplia de la enfermedad en vacas de traspatio provenientes de las regiones del Valle del Mezquital, Valle de Tulancingo, Altiplanicie Pulquera y Comarca Minera localizadas al sur del estado de Hidalgo, México.

## 10. Literatura citada

- Anderson, M.L., Palmer, C.W., Thurmond, M.C, Picanso, J.P., Blanchard, P.C., Breitmeyer, R.E., Layton, A.W., McAllister, M., Daft, B., and Kinde, H., 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal of American Veterinary Medical* 207:1206–1210.
- Anderson, M.L.; Blanchard, P.C., Barr, B.C., Dubey, J.P., Hoffman, R.L., Conrad, P.A. 1991. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 198, 241-244.
- Anderson, M.L., Andrianarivo, A.G., Conrad, P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*. 60-61: 417-431.
- Atkinson, R.A., Cook, R.W., Reddacliff, L.A., Rothwell, J, Broady, K.W., Harper, P. and Ellis, J.T. 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. *Australian Veterinary Journal*. 78:262–266.
- Boulton, J.G., Gill, P.A., Cook, R.W., Fraser, G.C., Harper, P.A. and Dubey, J.P. 1995. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Australian Veterinary Journal*. 72:119–120.
- Bech-Sabat, G.F., López-Gatius, P., Santolaria, I., García-Ispuerto, Pabon, M., Nogareda, C., Yaniz, J.L., and Almeria, S. 2007. Progesterone supplementation during mid-gestation increases the risk of abortion in *Neospora* infected dairy cows with high antibody titres. *Veterinary Parasitology*. 145:164–167.

- Bergeron, N.G., Fecteau, Paré, J., Martineau, R. and Villeneuve, A. 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Quebec. The Canadian Veterinary Journal. 41:464–467.
- Bjerkas, I., Mohn, S.F., Presthus. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenk. 70:271-274.
- Björkman, C., McAllister, M.M., Frössling, J., Naäslund, K., Leung, F., Uggla, A., 2003. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 15, 3–7.
- Björkman, C., Ivarez-García G., Conraths, F.J., Mattsson J.G., Ortega-Mora, L.M., Sager, H. and Schares, G. 2006. *Neospora caninum* IgG avidity tests: an interlaboratory comparison. Veterinary Parasitology. 140:273–280.
- Baszler, T.V., Long, M.T., McElwain, T.F., Mathison, B.A. 1999. Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. International Journal Parasitology. 29: 1635-1646.
- Corbellini, L.G., Driemeier, D., Cruz, C.F.E, Gondim, L.F.P., and Wald, V. 2002. Neosporosis as a cause of abortion in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. Veterinary Parasitology. 103:195–202.
- Chanlun, A., Emanuelson, U., Chanlun, S., Aiumlamai, S., Björkman, C., 2006. Application of repeated bulk milk testing for identification of infection dynamics of *Neospora caninum* in Thai dairy herds. Veterinary Parasitology. 136, 243–250.
- De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Gasbarre, L. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and

cellular immune responses. *International Journal Parasitology*. 29: 1647-1657.

Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. (1996): A review of *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 67: 1-59.

Dubey, J.P. and Lindsay, D.S. 1996. A review of *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 67: 1-59.

Dubey, J.P., Barr, B., Barta, J., Bjerkäs, I., Björkman, C., Blagburn, B., Bowman, D., Buxton, D., Ellis, J., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D., Howe, D., Jenkins, M., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A., Mattson, J., Mcallister, M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L., Speer, C., Trees, A., Uggla, A., Upton, S., Williams, D., Lindsay, D. 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal Parasitology*. 32:929-946.

Dubey, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal Parasitology*. 2003; 41:1-16.

Dubey, J.P., Sreekumar, C., Knickman, E., Miska, K., Vianna, M., Kwok, O., Hill, D., Jenkins, M., Lindsay, D., Green, C. 2004. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *International Journal Parasitology*. 34: 1157-1167.

Dubey, J.P. 2005. Neosporosis in Cattle. *Veterinary Clinics of north America Food Animal*. 21. 473-483.

Dubey, J.P., Buxton, D., Wouda, W. 2006. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *Journal Comparative Pathology*. Vol. 134, 267-289.

- Dubey, J.P., Schares, G., Ortega-Mora, M. 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. Clinical Microbiology Reviews, Vol. 20, No. 2. 323-367.
- Escamilla, H.P., Martinez, M.J.J, Medina, C.M, Morales, S.E. 2007. Frequency and causes of infectious abortion in a dairy herd in Queretaro Mexico. The Canadian Journal Veterinary Research. 71:314-317.
- García, V.Z., Cruz, V.C., Medina, E.L., García, T.D., Chavarría, M.B. 2002. Serological Survey of *Neospora caninum* infection in Dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico. Veterinary Parasitology. 106(2):115-20.
- García-Vázquez, Z., Rosario-cruz, R., Ramos, Aragón, A., Cruz-Vázquez, C., Mapes-Sanchez, G. 2005. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. Veterinary Parasitology. 134 61-65.
- Georgieva, D.A., Prelezov, P.N., Koinarski, V., T.S. 2006. *Neospora caninum* and neosporosis in animals-a review. Bulgarian Journal of Veterinary Medicine. 9. No. 1, 1-26.
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Mateus-Pinilla, N.E.W.C., Pitt, L.D., Mech, and Nelson, M.E. 2004a. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. Journal. Parasitology. 90:1361–1365.
- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M.R., Anderson-Sprecher, C.C., Björkman, T.F., Lock, L., Firkins, D., Gao, L. and Fischer, W. R. 2004b. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. Journal. Parasitology. 90:1394–1400.
- González, G.J. de J., Vázquez, C.C., Esparza, M.L., Flores, V.A., Ojeda, I.E., Vázquez, G.Z. 2007. Factores de manejo asociados con seroprevalencia a



- la infección por *Neospora caninum*, en el ganado lechero de Aguascalientes, México. Veterinaria México. Vol. 38, No. 003. 261-270.
- Guy, C.S., Williams, D.J.L., Kelly, D.F., McGarry, J.W., Guy, F., Björkman, C. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. Veterinary Record. 149: 443-449
- Hall, C.A., Reichel, M.P. and Ellis, J.T. 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. Veterinary Parasitology. 128:231–241.
- Hunter, C.A., Reiner, S.L. 2000. Cytokines and T cells in host defense. Current Opinion Immunology. 12: 413-418
- Lindsay, D.S., Dubey, J.P, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol 1999; 82:327-333.
- López-Gatius, F.I., García-Ispuerto, P., Santolaria, J.L., Yániz, M., López-Béjar, Norgareda, C., and Almeriá S. 2005. Relationship between rainfall and *Neospora caninum*-associated abortion in two dairy herds in a dry environment. Journal Veterinary Medical. B **52**:147–152.
- McAllister, M.M. 2001. Do cows protect fetuses from *Neospora caninum* transmission? Trends in Parasitology. 17: 6.
- McEwen, B., Hazlett, M., Archambault, M., Carman, S. and Alves, D. 2001. Bovine abortion update, 1993–2001. Animal Health Laboratory. Newsl. University of Guelph 5:5–7.
- Meléndez, S. J.A., García, M.J. de J.; Ramos, Z.J.J., Valdés, R.V.M., Vidal, H.G., Aranda, D.G., Romero, R.R., Alejo, G.L.C., Ramírez, A.R. 2005. Frecuencia

de anticuerpos contra *Neospora caninum* en ganado bovino del noreste de México. Veterinaria México 36 (3).

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

Morales, S.E., Trigo, T.F.J. 1996d. Neosporosis como causa de aborto en el ganado bovino. Ciencia Veterinaria 7, 1-19.

Morales, S.E., Ramírez, L.J., Trigo, T.F.J., Ibarra, V.F., Puente, C. E., Santacruz, M. 1997 b. Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora* sp en México. Veterinaria México. 28 (4) 353-357.

Morales, S.E., Trigo, T.F.J., Ibarra, V.F., Puente, C.E., Santacruz, M. 2001a. Neosporosis in Mexican Dairy Herds: Lesions and Immunohistochemical Detection of *Neospora caninum* in Fetuses. Journal Comparative Pathology. Vol. 125, 58-63.

Morales, S.E., Trigo, T.F.J.; Ibarra, V.F., Puente, C.E., Santacruz, M. 2001c. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. Journal Veterinary Diagnostic Investigation 13:413-415.

Morales, S.E., Trigo, T.F.J., Ibarra, V.F., Puente, C.E.; Santacruz, M. 2001d. Neosporosis in Mexican Dairy Herds: Lesions and Immunohistochemical Detection of *Neospora caninum* in fetuses. Journal Comparative Pathology. Vol. 125, 58-63.

Moore, D.P., Odeón, A.C., Venturini, M.C., Campero, C.M. 2005. Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. Revista Argentina de Microbiología. 37: 217-228.

- Paré, J., Thurmond, M.C., and Hietala, S.K. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo d mortality. Canadian Journal of Veterinary Research. 60:133–139.
- Paré, J., Thurmond, M.C. and Hietala, S.K. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. Journal Parasitology. 83:82–87.
- Quintanilla-Gonzalo, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L.M., 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection–abortion and gestational antibody fluctuations. International Journal for Parasitology.30, 900–906.
- Rivera, G.H., Benito, Z.A., Ramos, C.O., Manchego, S.A. 2004. Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de la estación experimental de trópico del centro de investigaciones IVITA. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú; 15 (2):120-126.
- Reiterova, K., Spilovska, S., Antolova, D., Dubinsky. 2009. *Neospora caninum*, potencial cause of abortions in Dairy cows: The current serological follow-up in Slovakia. Veterinary Parasitology 159, 1-6.
- Sanchez, G.F., Morales, S.E., Martinez, M.J., Trigo, J.F. 2003. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. The Canadian Journal of Veterinary Research. 67:142-145.
- SAS Procedures Guide Statistics, (release 6.03) 1988. SAS Institute, Inc. Cary, NC.
- Sager, H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, Boerlin, P., Audigé, L., Gottstein. 2001. A swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-

- associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Veterinary Parasitology* 102 (2001) 1-15.
- Innes, E. 2007. The Host- Parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Journal Cambridge, Parasitology*, 134: 1903-1910.
- Sager, H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, A., Boerlin, P., Audigé, L., Gottstein, B. 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Veterinary Parasitology*. 102, 1–15.
- Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T. 2000. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Veterinary Parasitology*. 90: 247-252.
- Stenlund S. 2000. *Neospora caninum* in cattle in Sweden. Thesis doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences.. Uppsala, Suecia. 40 pp.
- Tizard J (1992) *Inmunología Veterinaria*. 4ª ed. Nueva Editorial Interamericana, S.A. México. pp. 280-294.
- Uggla, A.; Stenlund, S., Holmdahl O. 1998. *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *International Journal Parasitology* 28: 1467:1472
- Valenzuela, P. 2005. Neosporosis en bovinos y caninos. *Patología. Veterinaria*. 2 (1):17-33
- Venturini, M.C., Venturini, L. 2006. Actualización en la Neosporosis Bovina, Inmunidad. Reunión de la Academia de Agronomía y Veterinaria Balcarce.

Waldner, C.L. 2002. Pre-colostral antibodies to *Neospora caninum* in beef calves following an abortion outbreak and associated fall weaning weights. *Bovine Practitioner*. 36, 81–85.

## 11. Anexo

Cuadro.A1. Compilación de datos obtenidos.														
N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N	N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N	N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N
1	Actopan	1.074	2.030	P	18	Fco I Madero	1.604	2.732	P	9	Ixmiquilpan	0.325	0.141	N
2	Actopan	1.216	2.388	P	19	Fco I Madero	1.491	2.499	P	10	Ixmiquilpan	0.458	0.477	N
3	Actopan	1.629	3.430	P	20	Fco I Madero	1.501	2.520	P	11	Ixmiquilpan	0.985	1.806	P
4	Actopan	0.891	1.569	P	21	Fco I Madero	1.280	2.065	P	12	Ixmiquilpan	0.308	0.098	N
5	Actopan	0.482	0.537	P	22	Fco I Madero	0.550	0.561	P	13	Ixmiquilpan	0.267	-0.005	N
6	Actopan	0.326	0.144	N	23	Fco I Madero	1.186	1.871	P	14	Ixmiquilpan	0.329	0.151	N
7	Actopan	1.488	3.074	P	24	Fco I Madero	1.647	2.821	P	15	Ixmiquilpan	0.344	0.137	N
8	Actopan	0.879	1.239	P	25	Fco I Madero	1.524	2.567	P	16	Ixmiquilpan	1.627	2.780	P
9	Actopan	0.296	0.038	N	26	Fco I Madero	0.316	0.079	N	17	Ixmiquilpan	0.285	0.015	N
10	Actopan	0.275	-0.005	N	27	Fco I Madero	1.639	2.804	P	18	Ixmiquilpan	0.299	0.044	N
11	Actopan	1.601	2.726	P	28	Fco I Madero	1.562	2.646	P	19	Ixmiquilpan	0.777	1.029	P
12	Actopan	1.280	2.065	P	29	Fco I Madero	0.378	0.207	N	20	Ixmiquilpan	1.371	2.252	P
13	Actopan	0.986	1.459	P	30	Fco I Madero	1.333	2.174	P	21	Ixmiquilpan	0.317	0.081	N
1	Chilcuautila	0.309	0.021	N	31	Fco I Madero	0.691	0.852	P	22	Ixmiquilpan	0.293	0.032	N
2	Chilcuautila	0.291	0.001	N	32	Fco I Madero	1.965	3.476	P	23	Ixmiquilpan	0.451	0.357	N
3	Chilcuautila	0.717	0.474	P	33	Fco I Madero	0.252	-0.053	N	24	Ixmiquilpan	0.341	0.131	N
1	Fco I Madero	0.314	0.113	N	34	Fco I Madero	0.331	0.110	N	25	Ixmiquilpan	1.084	1.661	P
2	Fco I Madero	1.237	2.441	P	35	Fco I Madero	0.919	1.321	P	26	Ixmiquilpan	0.436	0.326	N
3	Fco I Madero	1.234	2.434	P	36	Fco I Madero	1.658	2.843	P	27	Ixmiquilpan	1.477	2.471	P
4	Fco I Madero	1.234	1.970	P	37	Fco I Madero	1.425	2.364	P	28	Ixmiquilpan	1.438	2.390	P
5	Fco I Madero	1.540	2.600	P	38	Fco I Madero	1.054	1.599	P	29	Ixmiquilpan	1.256	2.015	P
6	Fco I Madero	1.134	1.764	P	39	Fco I Madero	0.298	0.008	N	30	Ixmiquilpan	0.486	0.429	N
7	Fco I Madero	0.217	-0.125	N	40	Fco I Madero	0.351	0.067	N	31	Ixmiquilpan	1.455	2.425	P
8	Fco I Madero	1.392	2.296	P	41	Fco I Madero	0.974	0.760	P	32	Ixmiquilpan	1.383	2.277	P
9	Fco I Madero	0.314	0.075	N	42	Fco I Madero	1.669	1.533	P	33	Ixmiquilpan	1.270	2.044	P
10	Fco I Madero	0.391	0.234	N	1	Ixmiquilpan	1.463	3.011	P	34	Ixmiquilpan	1.301	2.108	P
11	Fco I Madero	0.895	1.272	P	2	Ixmiquilpan	0.482	0.537	P	35	Ixmiquilpan	1.463	2.442	P
12	Fco I Madero	1.406	2.324	P	3	Ixmiquilpan	1.355	2.739	P	36	Ixmiquilpan	0.243	-0.071	N
13	Fco I Madero	1.115	1.725	P	4	Ixmiquilpan	1.336	2.691	P	37	Ixmiquilpan	1.621	2.767	P
14	Fco I Madero	1.265	2.034	P	5	Ixmiquilpan	1.677	3.551	P	38	Ixmiquilpan	0.297	0.040	N
15	Fco I Madero	0.645	0.757	P	6	Ixmiquilpan	0.343	0.187	N	39	Ixmiquilpan	0.668	0.804	P
16	Fco I Madero	1.392	2.296	P	7	Ixmiquilpan	0.598	0.830	P	40	Ixmiquilpan	1.547	1.398	P
17	Fco I Madero	1.546	2.613	P	8	Ixmiquilpan	0.260	-0.023	N	41	Ixmiquilpan	0.362	0.080	N

Muestra el número total de cada municipio, el nombre del municipio, valores de densidad óptica obtenidos a una absorbancia de 630nm, el resultado del cálculo de los valores S/P y las muestras que fueron positivas (P) y negativas (N).

Cuadro A2.-Compilación de datos obtenidos.														
N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N	N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N	N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N
42	Ixmiquilpan	0.350	0.066	N	75	Ixmiquilpan	1.299	1.122	P	33	Nopala de Villagrán	0.339	0.177	N
43	Ixmiquilpan	0.256	-0.038	N	1	Mixquiahuala de Juárez	0.323	0.036	N	34	Nopala de Villagrán	0.269	0.000	N
44	Ixmiquilpan	0.344	0.060	N	2	Mixquiahuala de Juárez	1.363	2.236	P	35	Nopala de Villagrán	0.807	1.357	P
45	Ixmiquilpan	0.917	0.697	P	3	Nopala de Villagrán	0.370	0.255	N	36	Nopala de Villagrán	1.405	2.865	P
46	Ixmiquilpan	1.251	1.068	P	4	Nopala de Villagrán	0.396	0.320	N	37	Nopala de Villagrán	0.268	-0.003	N
47	Ixmiquilpan	0.263	-0.031	N	5	Nopala de Villagrán	0.267	-0.005	N	38	Nopala de Villagrán	1.306	2.615	P
48	Ixmiquilpan	0.247	-0.048	N	6	Nopala de Villagrán	1.586	3.322	P	39	Nopala de Villagrán	1.146	2.212	P
49	Ixmiquilpan	0.211	-0.088	N	7	Nopala de Villagrán	1.240	2.449	P	40	Nopala de Villagrán	0.315	0.116	N
50	Ixmiquilpan	0.278	-0.014	N	8	Nopala de Villagrán	1.319	2.648	P	41	Nopala de Villagrán	1.046	1.960	P
51	Ixmiquilpan	0.261	-0.033	N	9	Nopala de Villagrán	0.710	1.112	P	42	Nopala de Villagrán	0.930	1.667	P
52	Ixmiquilpan	1.548	1.399	P	10	Nopala de Villagrán	1.280	2.550	P	43	Nopala de Villagrán	1.291	2.578	P
53	Ixmiquilpan	0.233	-0.064	N	11	Nopala de Villagrán	0.972	1.773	P	1	Progreso de Obregón	0.499	0.580	P
54	Ixmiquilpan	0.675	0.428	N	12	Nopala de Villagrán	0.338	0.174	N	2	Progreso de Obregón	1.550	3.231	P
55	Ixmiquilpan	0.831	0.601	P	13	Nopala de Villagrán	1.314	2.636	P	1	San Agustín Tlaxiaca	0.467	0.499	N
56	Ixmiquilpan	1.376	1.207	P	14	Nopala de Villagrán	1.482	3.059	P	2	San Agustín Tlaxiaca	1.500	3.105	P
57	Ixmiquilpan	0.657	0.408	N	15	Nopala de Villagrán	1.213	2.381	P	3	San Agustín Tlaxiaca	0.343	0.187	N
58	Ixmiquilpan	0.264	-0.029	N	16	Nopala de Villagrán	1.415	2.890	P	4	San Agustín Tlaxiaca	0.327	0.146	N
59	Ixmiquilpan	0.263	-0.031	N	17	Nopala de Villagrán	0.333	0.161	N	5	San Agustín Tlaxiaca	0.320	0.129	N
60	Ixmiquilpan	0.305	0.016	N	18	Nopala de Villagrán	1.396	2.842	P	1	San Salvador	1.263	2.507	P
61	Ixmiquilpan	0.325	0.038	N	19	Nopala de Villagrán	1.369	2.774	P	2	San Salvador	0.458	0.477	N
62	Ixmiquilpan	0.265	-0.028	N	20	Nopala de Villagrán	1.566	3.271	P	3	San Salvador	1.478	3.049	P
63	Ixmiquilpan	1.575	1.429	P	21	Nopala de Villagrán	1.139	2.194	P	4	San Salvador	0.576	0.774	P
64	Ixmiquilpan	0.264	-0.029	N	22	Nopala de Villagrán	1.362	2.757	P	5	San Salvador	1.608	2.740	P
65	Ixmiquilpan	1.031	0.824	P	23	Nopala de Villagrán	0.306	0.093	N	6	San Salvador	0.258	-0.040	N
66	Ixmiquilpan	0.791	0.557	P	24	Nopala de Villagrán	1.206	2.363	P	7	San Salvador	1.461	2.438	P
67	Ixmiquilpan	1.096	0.896	P	25	Nopala de Villagrán	0.353	0.212	N	8	San Salvador	0.331	0.110	N
68	Ixmiquilpan	0.383	0.103	N	26	Nopala de Villagrán	1.297	2.593	P	9	San Salvador	1.185	1.869	P
69	Ixmiquilpan	0.401	0.123	N	27	Nopala de Villagrán	1.138	2.192	P	10	San Salvador	1.119	1.733	P
70	Ixmiquilpan	1.656	1.519	P	28	Nopala de Villagrán	0.558	0.729	P	11	San Salvador	1.515	2.549	P
71	Ixmiquilpan	0.328	0.042	N	29	Nopala de Villagrán	1.487	3.072	P	12	San Salvador	1.450	2.415	P
72	Ixmiquilpan	1.006	0.796	P	30	Nopala de Villagrán	1.135	2.184	P	13	San Salvador	0.750	0.973	P
73	Ixmiquilpan	0.424	0.148	N	31	Nopala de Villagrán	1.057	1.987	P	14	San Salvador	0.276	-0.003	N
74	Ixmiquilpan	0.918	0.698	P	32	Nopala de Villagrán	0.289	0.050	N	15	San Salvador	1.758	3.049	P

Muestra el número total de cada municipio, el nombre del municipio, valores de densidad óptica obtenidos a una absorbancia de 630nm, el resultado del cálculo de los valores S/P y las muestras que fueron positivas (P) y negativas (N).

Cuadro A3. Compilación de datos obtenidos.

N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N	N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N	N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N
16	San Salvador	1.167	1.832	P	7	Tepetitlán	0.258	-0.024	N	10	Acatlán	0.458	0.186	N
17	San Salvador	0.414	0.281	N	8	Tepetitlán	1.926	1.731	P	11	Acatlán	0.835	0.606	P
18	San Salvador	1.314	2.135	P	9	Tepetitlán	2.301	2.125	P	12	Acatlán	2.050	1.957	P
19	San Salvador	1.597	2.718	P	10	Tepetitlán	0.320	0.041	N	13	Acatlan	1.090	0.889	P
20	San Salvador	0.351	0.151	N	11	Tepetitlán	0.284	0.003	N	14	Acatlán	0.396	0.117	N
21	San Salvador	0.282	0.009	N	12	Tepetitlán	1.662	1.453	P	15	Acatlán	0.693	0.448	N
22	San Salvador	1.178	1.855	P	13	Tepetitlán	0.280	-0.001	N	16	Acatlán	0.232	-0.065	N
23	San Salvador	0.361	0.078	N	14	Tepetitlán	1.758	1.554	P	17	Acatlán	0.246	-0.049	N
24	San Salvador	1.795	1.674	P	15	Tepetitlán	0.287	0.006	N	18	Acatlán	1.596	1.452	P
25	San Salvador	1.524	1.372	P	16	Tepetitlán	2.078	1.891	P	19	Acatlán	1.474	1.316	P
1	Tepeji del Río de Ocampo	1.595	1.382	P	17	Tepetitlán	0.953	0.707	P	20	Acatlán	0.257	-0.037	N
2	Tepeji del Río de Ocampo	0.280	-0.001	N	1	Tezontepec de Aldama	1.031	1.922	P	21	Acatlán	1.363	1.193	P
3	Tepeji del Río de Ocampo	0.277	-0.004	N	2	Tezontepec de Aldama	1.041	1.947	P	22	Acatlán	0.289	-0.002	N
4	Tepeji del Río de Ocampo	0.548	0.281	N	3	Tezontepec de Aldama	1.086	2.061	P	23	Acatlán	0.816	0.585	P
5	Tepeji del Río de Ocampo	0.315	0.036	N	4	Tezontepec de Aldama	0.305	0.091	N	24	Acatlán	0.273	-0.019	N
6	Tepeji del Río de Ocampo	0.273	-0.008	N	5	Tezontepec de Aldama	1.456	2.994	P	25	Acatlán	0.385	0.105	N
7	Tepeji del Río de Ocampo	0.361	0.084	N	6	Tezontepec de Aldama	0.675	1.024	P	26	Acatlán	0.286	-0.005	N
8	Tepeji del Río de Ocampo	0.349	0.072	N	7	Tezontepec de Aldama	0.341	0.182	N	27	Acatlán	0.840	0.611	P
9	Tepeji del Río de Ocampo	0.327	0.048	N	8	Tezontepec de Aldama	1.162	2.252	P	28	Acatlán	0.292	0.002	N
10	Tepeji del Río de Ocampo	0.280	-0.001	N	9	Tezontepec de Aldama	1.202	2.353	P	29	Acatlán	1.793	1.671	P
11	Tepeji del Río de Ocampo	1.445	1.225	P	10	Tezontepec de Aldama	1.057	1.606	P	30	Acatlán	1.925	1.730	P
12	Tepeji del Río de Ocampo	0.254	-0.028	N	11	Tezontepec de Aldama	1.322	1.095	P	31	Acatlán	1.909	1.713	P
13	Tepeji del Río de Ocampo	1.815	1.614	P	1	Tula de Allende	0.267	-0.015	N	32	Acatlán	0.249	-0.034	N
14	Tepeji del Río de Ocampo	0.772	0.517	P	2	Tula de Allende	0.311	0.032	N	33	Acatlán	1.638	1.428	P
15	Tepeji del Río de Ocampo	0.848	0.597	P	1	Acatlan	0.266	-0.027	N	34	Acatlán	0.319	0.040	N
16	Tepeji del Río de Ocampo	0.280	-0.001	N	2	Acatlan	0.283	-0.008	N	35	Acatlán	1.924	1.729	P
17	Tepeji del Río de Ocampo	2.165	1.982	P	3	Acatlan	0.916	0.696	P	36	Acatlán	0.286	0.005	N
1	Tepetitlán	1.574	2.670	P	4	Acatlan	0.730	0.489	P	37	Acatlán	0.251	-0.032	N
2	Tepetitlán	0.803	1.082	P	5	Acatlan	1.729	1.600	P	38	Acatlán	1.781	1.578	P
3	Tepetitlán	0.588	0.640	P	6	Acatlan	1.176	0.985	P	39	Acatlán	0.275	-0.006	N
4	Tepetitlán	1.198	1.896	P	7	Acatlan	1.669	1.533	P	40	Acatlán	0.348	0.070	N
5	Tepetitlán	0.294	0.034	N	8	Acatlan	0.994	0.783	P	41	Acatlán	0.792	0.538	P
6	Tepetitlán	0.317	0.081	N	9	Acatlan	0.242	-0.054	N	42	Acatlán	2.142	1.958	N

Muestra el número total de cada municipio, el nombre del municipio, valores de densidad óptica obtenidos a una absorbancia de 630nm, el resultado del cálculo de los valores S/P y las muestras que fueron positivas (P) y negativas (N).



Cuadro A4. Compilación de datos obtenidos.									
N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N	N=	MUNICIPIO	O.D	S/P	P/N
43	Acatlan	0.343	0.065	N	12	Metepec	0.957	0.711	P
44	Acatlan	0.987	0.743	P	13	Metepec	1.905	1.709	P
45	Acatlan	1.622	1.411	P	14	Metepec	1.584	1.371	P
46	Acatlan	0.945	0.699	P	15	Metepec	0.323	0.044	N
47	Acatlan	0.993	0.749	P	16	Metepec	0.340	0.062	N
48	Acatlan	1.228	0.996	P	17	Metepec	1.755	1.551	P
49	Acatlan	0.814	0.561	P	18	Metepec	1.796	1.594	P
1	Acaxochitlán	0.274	-0.018	N	19	Metepec	1.824	1.623	P
1	Cuautepec de Hinojosa	1.767	1.563	P	20	Metepec	0.645	0.383	N
2	Cuautepec de Hinojosa	0.392	0.117	N	21	Metepec	1.870	1.672	P
3	Cuautepec de Hinojosa	1.960	1.766	P	22	Metepec	0.269	-0.013	N
4	Cuautepec de Hinojosa	0.288	0.007	N	23	Metepec	1.999	1.807	P
5	Cuautepec de Hinojosa	1.894	1.697	P	24	Metepec	0.318	0.039	N
6	Cuautepec de Hinojosa	1.464	1.245	P	25	Metepec	1.948	1.754	P
7	Cuautepec de Hinojosa	2.058	1.870	P	26	Metepec	0.411	0.137	N
8	Cuautepec de Hinojosa	0.327	0.048	N	1	Tulancingo de Bravo	0.358	0.075	N
9	Cuautepec de Hinojosa	0.281	0.000	N	2	Tulancingo de Bravo	0.367	0.085	N
10	Cuautepec de Hinojosa	0.268	-0.014	N	3	Tulancingo de Bravo	0.282	-0.009	N
11	Cuautepec de Hinojosa	1.706	1.499	P	4	Tulancingo de Bravo	0.307	0.018	N
12	Cuautepec de Hinojosa	1.479	1.260	P	5	Tulancingo de Bravo	0.649	0.387	N
13	Cuautepec de Hinojosa	1.833	1.633	P	1	Zempoala	1.226	2.414	P
14	Cuautepec de Hinojosa	0.371	0.095	N	2	Zempoala	1.470	3.029	P
1	Metepec	0.280	-0.001	N	3	Zempoala	1.446	2.968	P
2	Metepec	2.085	1.898	P	4	Zempoala	0.252	-0.043	N
3	Metepec	1.046	0.805	P	5	Zempoala	0.614	0.360	N
4	Metepec	0.279	-0.002	N	6	Zempoala	0.275	-0.017	N
5	Metepec	1.399	1.176	P	7	Zempoala	0.730	0.489	N
6	Metepec	0.625	0.362	N	8	Zempoala	1.588	1.443	P
7	Metepec	0.324	0.045	N	1	Pachuca de Soto	0.304	0.088	N
8	Metepec	1.955	1.761	P	2	Pachuca de Soto	0.834	1.425	P
9	Metepec	1.847	1.648	P	1	Mineral de la Reforma	0.945	1.705	P
10	Metepec	0.701	0.442	N	2	Mineral de la Reforma	1.627	1.487	P
11	Metepec	2.104	1.918	P					

Muestra el número total de cada municipio, el nombre del municipio, valores de densidad óptica obtenidos a una absorbancia de 630nm, el resultado del cálculo de los valores S/P y las muestras que fueron positivas (P) y negativas (N).