

Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en ganado lechero de Aguascalientes, México

Risk factors associated with *Neospora caninum* antibody seroprevalence in dairy cattle in Aguascalientes, Mexico

Rocío Conzuelo Sierra^a, Leticia Medina-Esparza^a Miguel Ramos Parra^a, Zeferino García-Vázquez^b, Carlos Cruz-Vázquez^a

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue identificar potenciales factores de riesgo, incluyendo la posible presencia de contaminación del agua de bebida con ooquistes del parásito, asociados con la seroprevalencia de anticuerpos a *N. caninum* en hatos lecheros de Aguascalientes, México. Se tomaron muestras de suero sanguíneo de 150 vacas, mismas que fueron analizadas por la técnica de ELISA, se detectó la presencia de ADN de *N. caninum* en el agua de bebida mediante una prueba de PCR anidada, y se aplicó una encuesta para identificar diferentes características y prácticas zootécnicas de los hatos. Se calculó la seroprevalencia a la infección por *N. caninum*, así como la frecuencia de detección de ADN del parásito en las muestras de agua de bebida. Se estimó la asociación entre la seroprevalencia y cada uno de los factores considerados como potenciales factores de riesgo, calculando la razón de momios (OR). La seroprevalencia a *N. caninum* fue de 30 %; se identificó ADN del parásito en el 90 % de las muestras de agua colectadas. Se identificaron a los siguientes potenciales factores de riesgo con un intervalo de confianza del 95 %: presencia de coyotes (OR= 2.40, 1.05 - 5.47, $P<0.05$), presencia de aves domésticas en el establo (OR= 2.32, 1.06 - 5.3, $P<0.05$), antecedentes de la presencia de micotoxinas (OR= 4.16; 1.41 - 13.18, $P<0.05$), y los antecedentes de aborto (OR= 2.13, 0.95 - 4.81, $P<0.05$).

PALABRAS CLAVE: *Neospora caninum*, Factores de riesgo, Seroprevalencia, ADN, Agua.

ABSTRACT

The purpose of this research was to study potential risk factors, including possible contamination of drinking water with parasite oocysts, associated with the seroprevalence of *N. caninum* antibodies in dairy herds in Aguascalientes, Mexico. Serum samples from 150 cows were analyzed using the ELISA technique. *N. caninum* DNA was determined in the drinking water using the nested PCR test. A survey was undertaken as to identify different characteristics and husbandry practices among herds. Both *N. caninum* antibody seroprevalence and the frequency of *N. caninum* DNA in drinking water samples were calculated. The association between seroprevalence and each of the factors considered as potential risk factors was calculated by determining the odds ratio (OR). *N. caninum* seroprevalence was 30 %, and the DNA of this parasite was found in 90 % of the water samples collected. The following potential risk factors were identified with a confidence interval of 95%: presence of coyotes (OR= 2.40, 1.05- 5.47, $P<0.05$), presence of domestic poultry in the farm (OR= 2.32, 1.06-5.30, $P<0.05$), history of mycotoxins (OR= 4.16; 1.41-13.18, $P<0.05$), and abortion background (OR= 2.13, 0.95-4.81, $P<0.05$).

KEY WORDS: *Neospora caninum*, Risk Factors, Seroprevalence, DNA, Water.

INTRODUCCIÓN

La neosporosis bovina es una enfermedad causada por un parásito Apicomplexa, *Neospora caninum*, que puede provocar abortos entre el tercer y noveno

INTRODUCTION

Bovine neosporosis is a disease produced by the parasite *Neospora caninum* (Apicomplexa) that can cause abortion between 3 and 9 mo of gestation,

Recibido el 13 de diciembre de 2009. Aceptado el 13 de septiembre de 2010.

^a Instituto Tecnológico El Llano Aguascalientes. Apartado Postal 74-2, Administración Postal No.2, 20041 Aguascalientes, México. Tel. (449) 916-12-51; lmedinaesparza@yahoo.com.mx Correspondencia al segundo autor.

^b Centro Nacional de Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

mes de gestación, mortinatos, muerte neonatal, muerte fetal temprana y reabsorción embrionaria, provocando un efecto importante en diferentes parámetros reproductivos y en la producción de leche; afecta principalmente al ganado lechero y ha sido reportada como una importante causa de aborto en diferentes partes del mundo⁽¹⁾. En México, se tiene información que permite conocer de la presencia de *N. caninum* y su amplia distribución en el país, principalmente en el ganado lechero, en el cual la enfermedad se considera endémica⁽²⁻⁵⁾.

En la epidemiología de la neosporosis bovina, la transmisión vertical es reconocida como la principal ruta para mantener la infección en el ganado, los becerros son infectados vía transplacentaria en madres crónicamente infectadas; este mecanismo es altamente eficiente y permite el nacimiento de crías clínicamente sanas pero infectadas^(1,6). La otra ruta de infección la representa la transmisión horizontal, en la cual el perro⁽⁷⁾ y el coyote⁽⁸⁾, que han sido descritos como huéspedes definitivos de *N. caninum*, aparecen como principales responsables al excretar oocistos en las heces, y con ello contaminar agua de bebida y alimentos; a causa de las características intrínsecas de la transmisión horizontal, las rutas y posibilidades de infección pueden ser múltiples^(1,6).

La identificación de factores de riesgo asociados a la infección por *N. caninum* utilizando el estatus serológico de la población, ha sido una herramienta empleada en diversos estudios con la finalidad de detectar elementos que permitan poner en práctica medidas de control que ayuden a reducir la frecuencia e impacto de esta parasitosis ante la ausencia de tratamientos efectivos⁽¹⁾.

El objetivo del estudio fue identificar potenciales factores de riesgo, incluyendo la posible presencia de contaminación del agua de bebida con oocistos del parásito, asociados con la seroprevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* en hatos lecheros de Aguascalientes, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el estado de Aguascalientes, México, el cual se encuentra localizado en la región

stillbirths, neonatal death, early fetal losses and embryo resorption, thus seriously impacting different reproductive parameters and milk yield. The disease affects mostly dairy cattle and it has been reported as an important cause of abortion in different parts of the world⁽¹⁾. Information shows that *N. caninum* is broadly distributed in Mexico, causing an endemic disease mainly among dairy cattle⁽²⁻⁵⁾.

Bovine neosporosis epidemiology considers vertical transmission as the main route of infection. Calves acquire the parasite by the trans-placental route from their chronically-infected dams. This mechanism is highly efficient leading to the birth of clinically-healthy, yet infected calves^(1,6). The disease can also be transmitted horizontally: dogs⁽⁷⁾ and coyotes⁽⁸⁾ have been described as the definitive hosts of *N. caninum*, and they shed oocysts in the feces thus contaminating cattle drinking water and feed. Due to the intrinsic characteristics of horizontal transmission, multiple possibilities and routes of infection can exist^(1,6).

Identifying *N. caninum* infection-associated risk factors based on population serological status has been used as a tool in several studies, aiming the identification of practical control measures to reduce the frequency and impact of this parasitic disease, in the absence of effective treatments⁽¹⁾.

The purpose of this research was to study potential risk factors, including possible contamination of drinking water with parasite oocysts, associated with the seroprevalence of *N. caninum* antibodies in dairy herds in Aguascalientes, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

The study was carried out in Aguascalientes, located in central northern Mexico, at 1,885 m asl, with an average temperature of 16.9 °C. Rainfall is 475 mm/annum, occurring in summer. Weather is extreme, temperate and semi-arid⁽⁹⁾.

Fifteen (15) technologically-managed dairies were selected using the convenience, non-probabilistic method. Adult cattle from these herds were randomly sampled from January to April 2008. Ten (10) blood samples from each of these dairies

centro-norte del país, a 1,885 msnm, temperatura promedio de 16.9 °C, precipitación de 475 mm por año, la cual se presenta en el verano, y clima semiárido templado y extremo⁽⁹⁾.

Se incluyeron en el estudio quince establos lecheros tecnificados, seleccionados por el método no probabilístico de conveniencia; en ellos se realizó un muestreo aleatorio de animales adultos, durante el periodo de enero a abril del 2008. Se colectaron muestras de sangre de 150 vacas, correspondiendo diez a cada uno de los establos incluidos en el estudio, por venopunción de la vena caudal con equipo vacutainer nuevo sin anticoagulante y se trasladaron al laboratorio para centrifugarse a 1,000 xg por 15 min; el suero recolectado se colocó en viales de polipropileno de 1.5 ml y se mantuvieron en congelación a -20 °C hasta su uso.

Los sueros se sometieron a la prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA), para detectar IgG específicas a *N. caninum*, utilizando el paquete comercial Herd Check anti-*N. caninum* (IDDEX Laboratories, Inc), con sensibilidad de 98.6 % y especificidad de 98.8 %, de acuerdo con el fabricante, siguiendo el procedimiento recomendado por el mismo. La prueba se realizó con una sola dilución de 1:100, identificando positivos y negativos a la absorbancia de 450 nm. Los sueros se probaron pareados, y el punto de corte fue de 0.50, considerándose como positivos los que tuvieron lecturas medias de ≥ 0.50 .

Con la finalidad de detectar la posible presencia de contaminación con ooquistes de *N. caninum* del agua de bebida usada en los establos, se llevó la detección de ADN del parásito de la siguiente forma: se tomaron 30 muestras de agua de bebida, dos por establo, correspondiendo una al bebedero ubicado en el corral de alojamiento principal, y la otra al depósito donde descarga el pozo de agua. Se colectaron dos litros de agua en una botella de vidrio estéril, para cada caso, homogenizando previamente el agua contenida en el bebedero o depósito y se trasladaron al laboratorio en condiciones de refrigeración. Para realizar la extracción de ADN se utilizó el paquete comercial Ultra Clean Water DNA Isolation (MOBIO

(total 150 samples) were collected from the caudal vein using new vacutainer devices with no anti-coagulant. Once in the laboratory, samples were centrifuged at 1,000 xg for 15 min. Serum was transferred to 1.5 ml polypropylene vials then frozen at -20 °C, until used.

Sera were subjected to the enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) to detect *N. caninum*-specific immunoglobulins G (IgG) using the commercially-available Herd Check anti-*N. caninum* (IDDEX Laboratories, Inc.) kit, with 98.6 % sensitivity and 98.8 % specificity, as claimed by the manufacturer. Label procedures were followed. The test was performed using one single dilution (1:100). Positive or negative samples were identified at an absorbance of 450 nm. Sera were pair-tested, and the cut point was 0.50. Sera with ≥ 0.50 mean readings were considered positive.

In order to determine the potential presence of *N. caninum* oocysts in the drinking water, parasitic DNA was detected as follows: Two (2) drinking water samples were collected per dairy (total: 30), one from the main pen drinker, and the other from the well discharge tank. In each case, drinker/tank water was first homogenized then 2 L were collected in a sterile glass bottle. Water samples were taken to the laboratory under refrigeration. DNA was extracted using Ultra Clean Water DNA Isolation kits (MOBIO Laboratories, Inc.). Manufacturer's directions were observed. DNA samples were subjected to nested polymerase chain reaction (PCR) analysis in one single tube, using the following primers: NF1, NS2, NR1, and SR1, similar to the technique described by Ellis *et al*⁽¹⁰⁾ Positive and negative controls were used as described by Medina *et al*⁽⁵⁾ DNA concentration in each sample was determined using an UV spectrophotometer then 5 μ l samples containing 2 μ g DNA were used for the PCR test. Amplification products were analyzed on 2.5% agarose gels, and a molecular weight marker (Phix 174 DNA, PROMEGA) was also run on each gel in order to estimate the molecular weight of the amplified product. Gels were stained with ethidium bromide then read using an UV lamp. Samples showing 146 base pair (bp) products were considered positive.

Laboratorios, Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN se sometieron a una PCR anidada en un solo tubo con los iniciadores NF1, NS2, NR1 y SR1, similar a la descrita por Ellis *et al.*⁽¹⁰⁾, utilizando controles positivos y negativos previamente definidos⁽⁵⁾. La concentración de ADN en cada muestra fue verificada por espectrofotómetro de luz UV y 5 µl de la muestra conteniendo 2 µg de ADN fueron usados en los ensayos de PCR. Los productos de la amplificación se analizaron en geles de agarosa al 2.5%, corriendo en cada gel un marcador de peso molecular (Phix 174 DNA, PROMEGA); para estimar el peso del producto amplificado, los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en una lámpara de luz UV. Se consideró como resultado positivo aquel que mostrara un producto de 146 pares de bases (pb).

Se diseñó una encuesta escrita cerrada en base a los reportes existentes en la literatura sobre los

A closed, written survey was designed, based on literature reports about major risk factors, and it was applied to all study dairy owners aiming to identify major traits and animal husbandry practices that could be related with the presence of *N. caninum*. The survey included four sections: a) definitive/intermediary hosts; b) feed/water; c) animal population and pen management; and d) abortion. Table 1 summarizes the risk factors considered in the survey.

The seroprevalence of *N. caninum* infection was calculated for the study population as well as the frequency of *N. caninum* DNA detection in drinking water samples. The association between seroprevalence and each potential risk factor was estimated based on the odds ratio (OR) where values >1 showed an association. Calculations were subjected to the Yates-corrected Chi² test ($P < 0.05$), using the EpiInfo 3.5.1 software.

Cuadro 1. Resumen de la encuesta utilizada para identificar posibles factores de riesgo para la neosporosis bovina

Table 1. Summary of the survey to identify potential bovine neosporosis risk factors

Item	Risk factors
Definitive/intermediate hosts	Dogs (household/free roaming), density, feeding, access to fetuses and fetal membranes. Presence of coyotes Presence of rodents (rats, mice, other) Presence of sheep Presence of poultry Presence of horses
Water/Feed	Water source Drinker cleaning (frequency) Drinker construction materials Ration (TMR, silage/concentrate) Feed storage site Feeder cleaning (frequency) History of mycotoxins in the feed
Animal population/Pen management	Breeds (Holstein Friesian, other) Number of animals/pen Group allocation/productive stage Replacement heifer origin
Abortion	Abortion history Management of placentas/fetuses

principales factores de riesgo que se han estudiado, la cual se aplicó directamente con los propietarios de cada estable incluido en el estudio, con el objetivo de identificar sus principales características y prácticas zootécnicas, mismas que pudieran relacionarse con la presencia de *N. caninum*. La encuesta se dividió en cuatro secciones las cuales fueron: a) huésped definitivo o intermediario, b) alimento-agua, c) población animal y manejo de corrales, y d) aborto. En el Cuadro 1 se resumen los factores de riesgo considerados en la encuesta.

Se calculó la seroprevalencia a la infección por *N. caninum*, para la población en estudio, así como la frecuencia de detección de ADN de *N. caninum* en las muestras de agua de bebida. Se estimó la asociación entre la seroprevalencia y cada uno de los potenciales factores de riesgo, calculando la razón de posibilidades o razón de momios (OR), en donde valores mayores de uno indicaron asociación, el cálculo se sometió a la prueba de Ji cuadrada con corrección de Yates ($P < 0.05$), realizando los procedimientos mediante el paquete EpiInfo 3.5.1.

Cuadro 2. Seroprevalencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en quince establos de la región lechera de Aguascalientes, México

Table 2. Seroprevalence of *Neospora caninum* antibodies among fifteen dairies in the Aguascalientes, Mexico region

Dairy	No. of animals	Seroprevalence (No)	CI 95%
E1	10	60	0.27 - 0.86
E2	10	40	0.14 - 0.73
E3	10	0	
E4	10	30	0.08 - 0.64
E5	10	20	0.08 - 0.64
E6	10	40	0.14 - 0.73
E7	10	60	0.27 - 0.86
E8	10	20	0.08 - 0.64
E9	10	40	0.14 - 0.73
E10	10	20	0.08 - 0.64
E11	10	10	0.00 - 0.46
E12	10	0	
E13	10	40	0.14 - 0.73
E14	10	30	0.08 - 0.64
E15	10	40	0.14 - 0.73
Total	150	30	0.14 - 0.27

CI = Confidence interval.

RESULTS

N. caninum antibody seroprevalence was 30 %. Eighty seven (87) percent (13/15) dairies in the study had at least one serologically-positive animal. Seroprevalence range was 10 to 60 % (Table 2). Seroprevalence distribution per lactation number is shown in Table 3 ($P > 0.05$). First lactation cows showed the lowest seroprevalence. Only two heifers were included in the study, one of which was serologically positive.

N. caninum DNA was identified in 90 % (27/30) of the drinking water samples (87 % [13/15] well discharge tanks, and 93 % [14/15] drinkers). Positive water samples were found in all dairies.

Then following potential risk factors were identified:

a) Presence of coyotes in the farms with an OR of 2.40 (CI 95%: 1.05 - 5.47; $P < 0.05$), seroprevalence was 45 % (18/40) in the dairies where coyotes were present, and 25 % (28/110) in those herds where no coyotes were reported; b) presence of domestic fowl in the dairy with an OR of 2.32 (CI 95 %: 1.06 - 5.3; $P < 0.05$) with a seroprevalence of 38 % (31/80) in the dairies with the presence of these birds, and 21 % (15/70) in those with no poultry; c) history of mycotoxins in the feed with an OR of 4.16 (CI 95%: 1.41 - 13.18; $P < 0.05$), the seroprevalence in dairies with mycotoxins was

Cuadro 3. Distribución de la seroprevalencia a *Neospora caninum* de acuerdo a la lactancia en que se encontraban las vacas

Table 3. Distribution of *Neospora caninum* seroprevalence per number of lactations

Lactation (No.)	Examined (No.)	Seropositive (No.)	Prevalence (%)	CI 95%
1st.	53	12	23	0.13 - 0.37
2nd.	40	14	35	0.21 - 0.51
3rd.	26	8	31	0.15 - 0.52
≥ 4th.	29	10	34	0.19 - 0.52
Heifers	2	1	50	0.02 - 0.97
Total	150	45	30	0.23 - 0.38

CI = Confidence interval.

RESULTADOS

La seroprevalencia de anticuerpos a *N. caninum* en la población estudiada fue de 30 %; el 87 % (13/15) de los establos incluidos en el estudio tuvieron al menos un animal seropositivo; en estos establos se observó que la seroprevalencia se presentó en una escala de 10 al 60 % (Cuadro 2). La distribución de la seroprevalencia de acuerdo a la lactancia en que se encontraban los animales, se muestra en el Cuadro 3, ($P>0.05$) observándose que las vacas de primera lactancia mostraron la menor seroprevalencia; en el estudio se incluyeron únicamente dos vaquillas y una de ellas fue seropositiva.

Se identificó ADN de *N. caninum* en el 90 % (27/30) de las muestras de agua colectadas; en las provenientes de los depósitos en donde descarga el pozo, se detectó 87 % (13/15) de las muestras como positivas y en las provenientes de bebederos fue el 93 % (14/15). En todos los establos hubo muestras de agua positivas.

Se identificaron como posibles factores de riesgo, a los siguientes: a) presencia de coyotes en los predios, en donde se observó una OR de 2.40 (IC 95%: 1.05 - 5.47; $P<0.05$), en este caso, la seroprevalencia fue de 45 % (18/40) en los establos con presencia de coyotes, y de 25 % (28/110) en los que no reportaron este evento; b) presencia de aves domésticas en el establo, en donde se observó una OR de 2.32 (IC 95%: 1.06 - 5.3; $P<0.05$), en este caso, la seroprevalencia fue de 38 % (31/80) en los establos con presencia de estas aves, y de 21 % (15/70) los que no reportaron esta situación; c) antecedentes de micotoxinas en el alimento, con una OR de 4.16 (IC 95%: 1.41 - 13.18; $P<0.05$), la seroprevalencia en establos con este antecedente fue de 37 % (41/110) y de 12 % (5/40) en los que estaba ausente, finalmente, d) antecedentes de aborto, con una OR de 2.13 (IC 95%: 0.95 - 4.81; $P<0.05$), la seroprevalencia en el grupo de vacas con antecedentes de aborto fue de 41 % (18/43), mientras que en el que no los presentó fue de 25 % (27/107). Para otros potenciales factores de riesgo incluidos en el estudio no fue posible demostrar asociación con la seroprevalencia.

37 % (41/110) and 12 % (5/40) in those with no mycotoxins; d) history of abortion, with an OR of 2.13 (CI 95%: 0.95 - 4.81; $P<0.05$) with a seroprevalence of 41 % (18/43) in the dairies with history of abortion, and 25 % (27/107) in those dairies with no history of abortion. No association with seroprevalence was demonstrated for any of the other potential risk factors included in the study.

DISCUSION

General seroprevalence in this study was high, but it was lower than that reported in other dairy regions in Mexico⁽⁴⁾. *N. caninum* infection is considered as endemic in Aguascalientes and in other dairy regions in the country^(4,11). First lactation cows showed a lower seroprevalence than those with more lactations. The literature shows that older cows typically have higher seroprevalence levels due to increased possibilities of contact with the parasite^(12,13). A comparison of our results with international reports shows similar seroprevalence levels among dairy cattle⁽¹⁾.

N. caninum infection persistency in the herds is typically associated with both vertical and horizontal transmission. The endemic nature of the disease and the high seroprevalence in a dairy or a region can only be explained by the simultaneous action of both transmission mechanisms, where the shedding of oocysts by the definitive host is the source of infection. Cattle ingest these oocysts in the drinking water and feed⁽⁶⁾. Recent studies have suggested oocyst contamination of water and forage as the cause of *N. caninum*-associated epidemic abortion outbreaks^(14,15). Our study identified the presence of *N. caninum* DNA in the drinking water of all dairies included in the study, representing a high potential risk of infection, even though we did not determine the viability of the oocysts contained in drinkers and water tanks. The contamination with viable oocysts from the feces of dogs and coyotes can occur in several manners, mostly by the wind, and not necessarily by the direct deposition of contaminated feces in the water or around water reservoirs. The climate in this region is semi-arid, thus intense sun radiation and high temperatures during the day time can rapidly

DISCUSIÓN

La seroprevalencia general estimada en el presente estudio fue elevada pero menor que la reportada previamente para esta región, que ha sido de 57.5 y 59 %^(3,11), y fue también más baja que la que se ha observado en otras regiones productoras de leche de México⁽⁴⁾; la infección por *N. caninum* es considerada como endémica en Aguascalientes y en otras regiones lecheras del país^(4,11). Las vacas de primera lactancia mostraron una menor seroprevalencia que las que contaban con más lactancias; en la literatura se informa que los animales de mayor edad generalmente muestran seroprevalencia más elevada pues tienen más posibilidades de tener contacto con el parásito^(12,13). Al comparar los resultados de este trabajo con los reportes en ganado lechero a nivel internacional, se puede observar que en otras regiones se han obtenido resultados similares en este tipo de ganado⁽¹⁾.

El mantenimiento de la infección por *N. caninum* en los hatos generalmente está asociada no solamente con la transmisión vertical, sino también con la horizontal; el estado endémico y la elevada seroprevalencia en un hato o en una región sólo pueden explicarse por la acción simultánea de ambos mecanismos de transmisión, en donde la presencia de ooquistes excretados por el huésped definitivo representan la fuente de infección al ser ingeridos por los bovinos a través de agua y otros alimentos⁽⁶⁾; algunos estudios han sugerido que la contaminación con ooquistes del agua de bebida y forraje pueden ser la causa de una infección reciente por *N. caninum* en brotes epidémicos de abortos^(14,15). En el presente estudio, se ha podido identificar la presencia de ADN del parásito en el agua de bebida de todos los establos incluidos en el estudio, lo cual representa un riesgo potencial de infección aunque no se conoce si los ooquistes contenidos en los bebederos o depósitos eran viables. La contaminación con heces fecales de perros y coyotes, y por tanto con ooquistes viables puede realizarse de diversas formas, principalmente por el viento, y no necesariamente por el depósito de heces contaminadas en el agua o en los alrededores de los depósitos de la misma. La región

dehydrate the fecal material. Likewise, due to low vegetation cover in the area, dust clouds are common nearly year-round, particularly during the dry season (October-June), so that canine manure dust can easily be transported in the air-suspended particles. Water reservoirs are open, thus prone to get contaminated with airborne particles. Water is not potabilized or filtered prior to be distributed for drinking among the pens in any of the dairies included in the study. In addition, no information exists about the impact of these water-cleaning measures on *N. caninum* oocysts.

The presence of coyotes has shown to be an important risk factor for the infection with *N. caninum*, and that the probability of infection is 2.4 fold greater due to the presence or sighting of these animals in the farms. Similar to wandering dogs and due to their feeding habits and behavior, coyotes are not constantly present in the farms. Two reports have determined coyotes as a definitive host of *N. caninum* and it is inferred that the presence of these animals increases the probabilities of cattle contact with oocysts, resulting in horizontal transmission and infection⁽⁸⁾. The epidemiological role of coyotes can be similar to and as important as that of wandering dogs. These aspects are too complex to be evaluated with precision, since both canine species have the same possibilities of ingesting fetuses and fetal membranes, as well as shedding feces in multiple locations.

The birds which presence was evaluated in this study (OR= 2.32) refer specifically to poultry (chickens and turkeys) roaming freely in the farm. Likewise, some dairymen own broiler houses neighboring their herds. Chickens (*Gallus domesticus*) have been recently reported as natural intermediate hosts of *N. caninum*⁽¹⁶⁾, while domestic pigeons (*Columbia livia*) have been infected experimentally⁽¹⁷⁾. Previous studies have reported the presence of fowl in association with epidemic abortion outbreaks⁽¹⁸⁾. The possibility exists for canine to eat chickens and other poultry positive to *N. caninum*. Nevertheless, the epidemiological role of this phenomenon as well as the coexistence of cattle with birds, wild resident/migratory birds included, must be studied with more detail.

de estudio posee un clima semiárido, en el cual la radiación solar intensa así como las altas temperaturas que se presentan durante el día, desecan en poco tiempo la materia fecal, asimismo es característico que ante la baja capa de cobertura vegetal, las tolvaneras sean comunes casi todo el año, particularmente en los meses secos que van de octubre a junio, así que el excremento de caninos puede fácilmente ser transportado como partículas suspendidas por el aire; los depósitos de agua de bebida son abiertos y susceptibles de ser receptáculos de las partículas de polvo transportadas por el viento. En ningún estable se filtra o potabiliza el agua de bebida que se distribuye a los corrales, aunque no se tiene información acerca del impacto de estas medidas para oocistas de *N. caninum*.

La presencia de coyotes mostró ser un importante potencial factor de riesgo a la infección por *N. caninum*, indicando que existen 2.4 veces más la probabilidad de que ocurra la infección por la presencia o avistamiento de estos animales en los predios, los cuales debido a sus hábitos alimenticios y de comportamiento, tienen una presencia irregular en los predios, similar a la de los perros vagabundos; al respecto, sólo existen estudios en los que se determina a los coyotes como huésped definitivo, infiriéndose que la presencia de los mismos aumenta la probabilidad del contacto con oocistas y por tanto de transmisión horizontal e infección⁽⁸⁾. Es probable que el papel epidemiológico de estos animales pueda ser similar y tan importante como el de los perros vagabundos e igual de complicado para evaluarlo con precisión, ya que tiene las mismas oportunidades que ellos para consumir fetos y placentas, así como de depositar heces en diferentes sitios.

La presencia de aves evaluada en este estudio (OR= 2.32), se refiere a la existencia de aves domésticas, como gallinas y guajolotes, deambulando libremente en el predio, y a la de aves de engorda, ya que algunos ganaderos mantienen casetas de pollo aledañas a las instalaciones del estable. Recientemente, se ha reportado que los pollos (*Gallus domesticus*) son huéspedes intermediarios naturales de *N. caninum*⁽¹⁶⁾, mientras que experimentalmente se ha logrado la infección en

The history of mycotoxins in the feed showed an OR of 4.6. The literature reports poor feed quality and feed contamination with mycotoxins as infection risk factors, since they induce immune depression. In the case of chronically-infected animals, this topic is still controversial since, among other reasons, the infection reactivation mechanisms remain unknown^(1,19). Nevertheless, the intake of mycotoxin-contaminated feed must be prevented and, if suspected, drug-based tools should be used to neutralize the potential risk of mycotoxins and mycotoxin-associated immune depression.

The risk of abortion associated with *N. caninum* positive status has been reported in Mexico and elsewhere^(1,20). Interestingly, the OR in our study (2.13) is higher than that reported previously in Aguascalientes by Gutiérrez *et al*⁽¹¹⁾ and García-Vázquez *et al*⁽³⁾ (1.4 prevalence ratio, and 1.4 OR, respectively) showing that even though seroprevalence has decreased, the risk of abortion remains latent, even if abortion is endemic.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

This study confirms a high *N. caninum* antibody seroprevalence in the area, and reports the detection of four potential risk factors associated with the seroprevalence, including the presence of coyotes and domestic fowl in the farms, a history of both mycotoxins in the feed and abortions, and the contamination of the drinking water with *N. caninum* oocysts, which can be responsible for acquired infections. All these factors should be considered when implementing measures for the control of this parasitic disease in cattle.

ACKNOWLEDGEMENTS

Gratitude is expressed to the dairymen participating in this study for their invaluable collaboration. This project was financed by DGEST-SEP (593.07-P).

End of english version

palomas domésticas, *Columbia livia*⁽¹⁷⁾, previamente otros estudios han reportado como factor de riesgo la presencia de aves al asociarse con episodios de abortos epidémicos⁽¹⁸⁾. La posibilidad de que los caninos se alimenten de pollos u otras aves domésticas positivas a *N. caninum* es latente, sin embargo el papel epidemiológico de esta situación así como de la convivencia entre estas aves, incluyendo a pájaros residentes o migratorios, y el ganado debe investigarse con más detenimiento.

Los antecedentes de micotoxinas en el alimento, mostraron un OR de 4.6; la literatura documenta que la mala calidad del alimento y la presencia de micotoxinas provocan un riesgo a la infección, ya que inducen a una inmunodepresión, facilitando la infección; en casos de animales crónicamente infectados, éste es un tópico todavía debatido, entre otras razones porque los mecanismos de reactivación de la infección son desconocidos^(1,19). Sin embargo, debe procurarse prevenir la ingestión de alimentos con micotoxinas, y ante la sospecha deben emplearse las herramientas farmacológicas disponibles para neutralizar su riesgo toxicológico potencial y la inmunodepresión asociada.

En la literatura se informa que tanto en México como en otros países, se ha demostrado la asociación entre el riesgo de aborto y ser positivos a *N. caninum*^(1,20), es interesante mencionar que la OR obtenida en el presente estudio (2.13), es más elevada que la observada en estudios anteriores realizados en Aguascalientes, donde Gutiérrez *et al*⁽¹¹⁾, mencionan una razón de prevalencia de 1.4 y García-Vázquez *et al*⁽³⁾, una OR de 1.4, lo que indica que aunque la seroprevalencia ha disminuido, el riesgo de aborto es latente, aún cuando éste sea endémico.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

El presente trabajo confirma la presencia de una elevada seroprevalencia de anticuerpos a *N. caninum* en el área de estudio y ha logrado detectar cuatro factores de riesgo potenciales asociados a la seroprevalencia, que incluyen a la presencia de coyotes y aves domésticas en los predios, los antecedentes de micotoxinas en el alimento y de

aborto, adicionalmente se ha detectado la contaminación del agua de bebida con ooquistes de *N. caninum*, que pueden ser responsables de infecciones adquiridas por su ingestión; todos estos factores que deberían considerarse al implementar medidas para prevenir esta enfermedad parasitaria.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los ganaderos participantes en este estudio por su invaluable colaboración. Este proyecto fue financiado por DGEST-SEP (593.07-P).

LITERATURA CITADA

- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 2007;20:323-367.
- Morales E, Trigo FJ, Ibarra F, Puente E, Santacruz M. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. J Comp Path 2001;125:58-63.
- García-Vázquez Z, Cruz-Vázquez C, García TD, Medina EL, Chavarria MB. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, México. Vet Parasitol 2002;106:115-120.
- García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Ramos-Aragón A, Cruz-Vázquez C, Mapes SG. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. Vet Parasitol 2005;134:61-65.
- 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;136:187-191.
- Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. J Comp Path 2006;134:267-289.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive host of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 1998;28:1473-1478.
- Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 2004;34:159-161.
- García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kopen. 4ª. Ed. DF, México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1988.
- Ellis JT, McMillan D, Ryce C, Payne S, Atkinson R, Harper PAW. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. Int J Parasitol 1999;29:1589-1596.
- Gutiérrez GJ, Cruz-Vázquez C, Medina EL, Valdivia FA, Islas OE, 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;38:261-270.
12. Jensen AM, Björkman C, Kjeldsen AM, Wedderkopp A, Willadsen C, Uggla A, Lind P. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev Vet Med* 199;40:151-163.
 13. Dyer RM, Jenkins MC, Kwok OCH, Douglas LW, Dubey JP. Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: Risk of serologic reactivity by production groups. *Vet Parasitol* 2000;90:171-181.
 14. McAllister MM, Björkman C, Anderson-Sprecher R, Rogers DG. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *J Am Vet Med Assoc* 2000;217:881-887.
 15. Jenkins MC, Caver JA, Björkman C, Anderson TC, Romand S, Vinyard B, Uggla A, Thulliez P, Dubey JP. Serological investigation of an outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in southeastern United States. *Vet Parasitol* 2000;94:17-26.
 16. Costa KS, Santos SL, Uzeda RS, Pinheiro AM, Almeida MA, Araújo FR, McAllister MM, Gondim LF. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2008;38:157-159.
 17. McGuire AM, McAllister MM, Wills RA, Tranas, JD. Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches (*Poephila guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol* 1999;29:1525-1529.
 18. Bartels CMJ, Wouda W, Schukken. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). *Theriogenology* 1999;52:247-257.
 19. Pfeiffer DU, Williamson NB, Reichel MP, Wichtel JJ, Teague WR. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Prev Vet Med* 202;54:11-24.
 20. González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Carro-Corral C, Cortizo-Mella J, Mezo M. Epidemiology of neosporosis in dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Parasitol Res* 2008;102:243-249.