



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA/CLÍNICA VETERINARIA**

**TESIS**

**FACTORES BIOPATOLÓGICOS PRESENTES EN BOVINOS HOLSTEIN  
EXPUESTOS NATURALMENTE A AFLATOXINAS Y *Neospora caninum***

**M. EN C. EMMANUEL HERNÁNDEZ VALDIVIA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**COMITÉ TUTORIAL:**

**DR. ARTURO GERARDO VALDIVIA FLORES (CO-TUTOR)**

**DRA. MA. CONSOLACIÓN MARTÍNEZ SALDAÑA (CO-TUTORA)**

**DR. CARLOS RICARDO CRUZ VÁZQUEZ**

Aguascalientes, Ags., Marzo de 2019



FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
PRESENTE

Por medio del presente le informamos que, en calidad Integrantes del Comité Tutorial, hemos revisado el documento de tesis del egresado del Doctorado en Ciencias Biológicas **EMMANUEL HERNÁNDEZ VALDIVIA**, con ID 13265, titulado:

**FACTORES BIOPATOLÓGICOS PRESENTES EN BOVINOS HOLSTEIN EXPUESTOS NATURALMENTE A AFLATOXINAS Y *Neospora caninum*,**

y considerando que estamos de acuerdo con su contenido y presentación, con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, le manifestamos que no tenemos ningún inconveniente en emitir el VOTO APROBATORIO correspondiente, para que pueda proceder a imprimirla, así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, nos permitimos enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 2 de diciembre de 2015.

Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores  
Co-tutor de tesis

Dra. Ma. Consolación Martínez Saldaña  
Co-tutora de tesis

Dr. Carlos Ricardo Cruz Vázquez  
Asesor de tesis

- c.c.p.- Interesado
- c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado
- c.c.p.- Consejero Académico
- c.c.p.- Minuta Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**EMMANUEL HERNÁNDEZ VALDIVIA**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**PRESENTE.**

Estimado alumno:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **"FACTORES BIOPATOLÓGICOS PRESENTES EN BOVINOS HOLSTEIN EXPUESTOS NATURALMENTE A AFLATOXINAS Y Neospora caninum,"**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

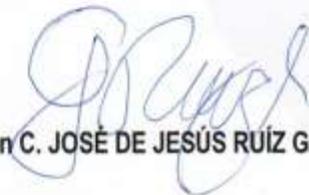
Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente,

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., a 28 de Febrero de 2019

*"Se lumen proferre"*

**EL DECANO**



**M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**

c.c.p.- Archivo.

## CARTA DE ACEPTACIÓN DEL ARTÍCULO

Prof. Carlos G. Gutiérrez <vetmexicooa@gmail.com>

Para: Dr Arturo Gerardo Valdivia-Fores

CC: Emmanuel Hernandez-Valdivia, Carlos Cruz-Vazquez, Ma. Consolacion Martinez-Saldaña, Teodulo Quezada-Tristan, Raul Ortiz-Martinez y 2 más...

13 feb a las 14:17

Dr Arturo Gerardo Valdivia-Fores:

We have reached a decision regarding your submission to Veterinaria México OA, "Reproductive and biochemical changes in long-term exposure to low-level aflatoxins in feed and transfer to milk of dairy cows".

Our decision is to:

Thank you for submitting your discoveries to Veterinaria Mexico OA. We find that your article suggests an interesting advance in Veterinary Science.

Nevertheless, major changes must be made to it before it can be considered for publication by the Editorial Board.

Please, read carefully the suggestions and comments in the review attached to this email. Within one month, send us (1) an amended manuscript, and (2) a thorough answer to each of the comments in the review.

Let us know, if you cannot send us your answers and amended manuscript by

[FECHA]

Dr Juan Carlos Ku Vera

[kvera@uady.mx](mailto:kvera@uady.mx)

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes instituciones por su apoyo económico para la realización del proyecto de tesis:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el otorgamiento de beca para realizar mis estudios de Doctorado en Ciencias Biológicas.
- Universidad Autónoma de Aguascalientes.
- Instituto Tecnológico el Llano Aguascalientes
- Universidad Complutense de Madrid.

Agradezco de igual manera por su dedicación, atención, apoyo y motivación que mostraron en mi desarrollo profesional pero sobre todo por apoyar mi crecimiento personal y ayudarme a salir adelante en mis momentos necesidad a los integrantes de mi Comité Tutorial:

- Dr. Arturo Gerardo Valdivia Flores, Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA.
- DRA. Ma. Consolación Martínez Saldaña, Centro de Ciencias Básicas de la UAA.
- DR. Carlos Ricardo Cruz Vázquez, Instituto Tecnológico el Llano Aguascalientes.
- Dr. Fernando Jaramillo Juárez, Centro de Ciencias Básicas de la UAA.

Por su asesoría y apoyo técnico durante la obtención, procesamiento y análisis de muestras biológicas:

- Dr. María Carolina de Luna López
- LCN. María Luisa Ramírez Vázquez, Laboratorio de Toxicología del Centro de Ciencias Básicas.
- M en C. Erika Janet Rangel Muñoz

## ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. ANTECEDENTES .....	11
2.1 PRODUCCIÓN LECHERA .....	11
2.2. AFLATOXINAS .....	12
2.2.1 Generalidades.....	12
2.2.2 Contaminación del ensilaje .....	13
2.2.3. Biotransformación .....	14
2.2.4 Signos y lesiones .....	16
2.2.5 Detección y cuantificación.....	17
2.2.6 Métodos de control de micotoxinas .....	18
2.2.7 <i>Sacharomyces cerevisiae</i> características.....	20
2.3 NEOSPOROSIS.....	22
2.3.1 Definición.....	22
2.3.2 Agente etiológico .....	22
2.3.3 Hospederos .....	22
2.3.4 Fases evolutivas y localización .....	22
2.3.5 Ciclo Biológico.....	25
2.3.6 Vías de transmisión.....	27
2.3.7 Signos Clínicos.....	28
2.3.8 Importancia Económica .....	29
2.3.9 Patogenia.....	30
2.3.10 Epidemiología.....	33
2.3.11 Diagnóstico .....	34
2.3.11.2 Diagnóstico histopatológico.....	35
2.3.11.3 Diagnóstico serológico. ....	35
2.3.11.4 Diagnóstico por biología molecular.....	36
2.3.12 Tratamiento y control.....	37
3.1 HIPÓTESIS .....	39
3.2 OBJETIVOS .....	39
3.2.1 Objetivo General.....	39
3.2.2 Objetivos Específicos .....	39
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
4.1 LUGAR DE ESTUDIO .....	40
4.2 DISEÑO DEL ESTUDIO .....	40
4.2.1 Selección de la Unidad Productora Lechera (UPL).....	40
4.2.2 Selección de Animales.....	41
4.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	41
4.3.1. Ensilaje de maíz .....	41
4.3.2 Concentrado .....	42
4.3.3 Ración total mezclada (RTM).....	43
4.3.4 Obtención de muestras de los animales .....	44
4.4 TÉCNICAS DIAGNOSTICAS .....	45
4.4.1 Determinación Aflatoxinas mediante HPLC.....	45
4.4.2 Cuantificación de aflatoxinas totales mediante ELISA.....	45

4.4.3	Tiempo de protrombina .....	46
4.4.4	Proteínas totales .....	46
4.4.5	Albúmina .....	46
4.4.6	Fosfatasa alcalina .....	46
4.4.7	Gamma-glutamyl transferasa .....	46
4.4.8	Alanina aminotransferasa .....	47
4.4.9	Aspartato aminotransferasa .....	47
4.4.10	Glutatión Reducido .....	47
4.4.11	Transferasas de glutatión .....	47
4.4.12	Técnica para la detección de anticuerpos contra <i>Neospora caninum</i> . .....	47
4.4.13	ELISA NcIgG, NcIgG <sub>1</sub> e NcIgG <sub>2</sub> . .....	48
4.4.14	ELISA NcSAG <sub>4</sub> y NcGRA <sub>7</sub> .....	48
4.4.15	ELISA de avidez .....	48
4.4.16	Inmunofluorescencia indirecta en suero precalostral. ....	48
4.4.17	Pruebas diagnósticas en fetos abortados (histopatología y PCR).....	49
4.5	ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN .....	49
5.	RESULTADOS .....	50
5.1	RESULTADOS CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS 1 <sup>a</sup> GESTACIÓN .....	50
5.2	RESULTADOS PRUEBAS BIOQUÍMICAS 1 <sup>a</sup> GESTACIÓN .....	51
5.3	RESULTADOS PRUEBAS INMUNOLÓGICAS 1 <sup>a</sup> GESTACIÓN.....	57
5.4	RESULTADOS HISTOPATOLOGÍA Y PCR EN FETOS ABORTADOS PRIMERA GESTACIÓN .....	62
5.5	RESULTADOS INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI) EN CRÍAS DE LA 1 <sup>a</sup> GESTACIÓN.....	63
5.6	RESULTADOS CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS 2 <sup>a</sup> GESTACIÓN .....	64
5.7	RESULTADOS PRUEBAS BIOQUÍMICAS 2 <sup>a</sup> GESTACIÓN .....	64
5.6	RESULTADOS PRUEBAS INMUNOLÓGICAS 2 <sup>a</sup> GESTACIÓN.....	70
6.	DISCUSIÓN .....	75
6.1	NIVELES DE CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN ALIMENTO ..	75
6.2	ALTERACIONES BIOQUÍMICAS OCASIONADAS POR LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN ALIMENTO .....	77
6.3	ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS OCASIONADAS POR LA INFECCIÓN DE <i>Neospora caninum</i> .....	80
6.4	INTERACCIÓN EXPOSICIÓN CRÓNICA A AFLATOXINAS EN LA DIETA Y EXPOSICIÓN NATURAL A <i>Neospora caninum</i> . .....	83
7.	CONCLUSIONES .....	85
8.	REFERENCIAS.....	86
9.	ANEXOS .....	97
9.1.	ANEXO 1. Carta de aceptación de artículo científico.....	98
9.2.	ANEXO 2. Artículo científico. ....	101
9.3.	ANEXO 3. Técnica para cromatografía líquida de alta presión para AF en maíz .....	124
9.4	ANEXO 4. Técnica para ensayo inmunoenzimático para AF en alimento. ....	124
9.5.	ANEXO 5. Técnica para la medición del tiempo de tiempo de protrombina. .	126

9.6. ANEXO 6. Técnica para la cuantificación de proteínas totales. .... 127

9.7. ANEXO 7. Técnica para la cuantificación de albúmina. .... 128

9.8. ANEXO 8. Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de fostatasa alcalina. .... 129

9.9. ANEXO 9. Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de Gamma-glutamyltranspeptidasa. .... 130

9.10. ANEXO 10. Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de alanina aminotransferasa. .... 131

9.11. ANEXO 11. Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de aspartato aminotransferasa. .... 132

9.12 ANEXO 12. Técnica para la cuantificación de glutatión reducido. .... 134

9.13. ANEXO 13. Técnica para la cuantificación de transferasas de glutatión. .... 135

9.14. ANEXO 14. Técnica para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*. .... 136

9.15. ANEXO 15. ELISA NcIgG, NcIgG<sub>1</sub> e NcIgG<sub>2</sub>. .... 137

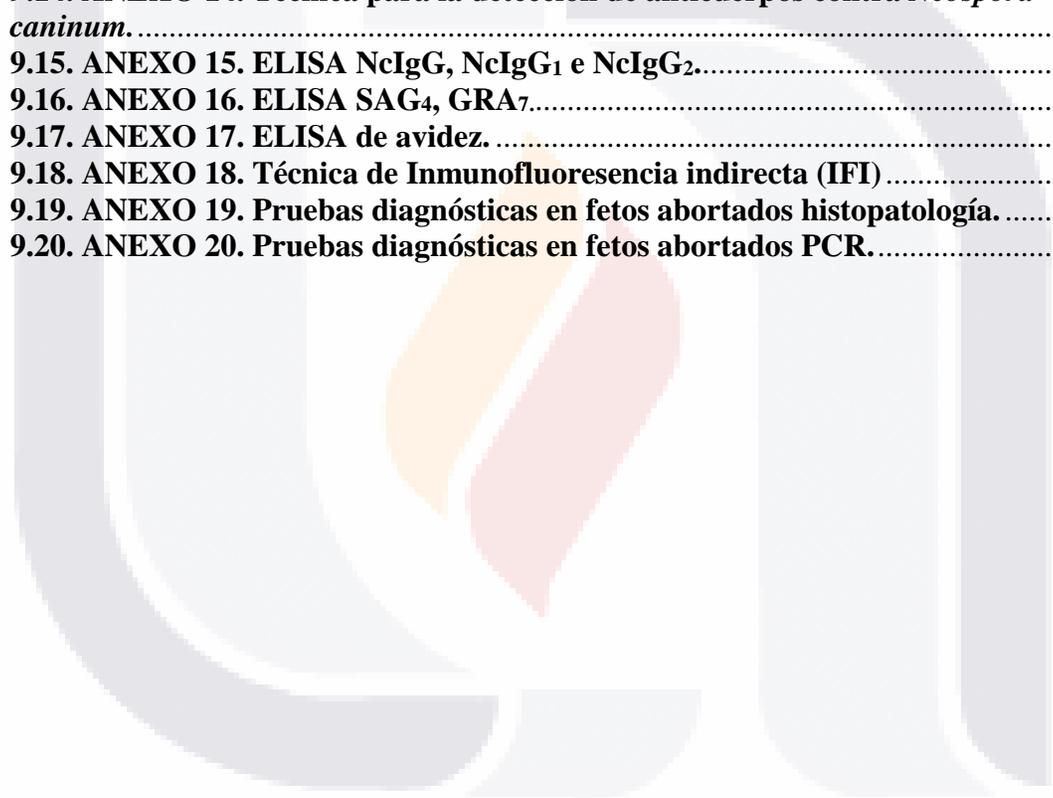
9.16. ANEXO 16. ELISA SAG<sub>4</sub>, GRA<sub>7</sub>. .... 139

9.17. ANEXO 17. ELISA de avidéz. .... 141

9.18. ANEXO 18. Técnica de Inmunofluoresencia indirecta (IFI) .... 143

9.19. ANEXO 19. Pruebas diagnósticas en fetos abortados histopatología. .... 145

9.20. ANEXO 20. Pruebas diagnósticas en fetos abortados PCR. .... 146



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No. 3 Estructura química de la AFB <sub>1</sub> (Palumbo & O’keeffe, 2008). .....	13
Figura No. 4 Proceso de biotransformación de las aflatoxinas.....	15
Figura No. 5 Posible interacción entre la ingestión de aflatoxinas y la infección por <i>Neospora caninum</i> en vacas gestantes ( <i>Fuente propia</i> ) .....	17
Figura No. 1 Estructura de un taquizoíto de <i>Neospora caninum</i> (adaptado de Aguado-Martínez, et al., 2005). .....	24
Figura No. 2 Ciclo biológico <i>Neospora caninum</i> (elaboración propia con datos de Dubey <i>et al.</i> , 2007).....	26
Figura No. 9 Concentración de Aflatoxinas totales en mediante ELISA (µg/kg) a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias de ingredientes (Prueba de Tukey, p<0.01). .....	50
Figura No. 10 Tiempo de protrombina (seg) en vacas lecheras (primera gestación) .....	51
Figura No. 11 Proteínas totales (g/L) en vacas lecheras (primera gestación).....	52
Figura No. 12 Albúmina (g/L) en vacas lecheras (primera gestación).....	52
Figura No. 13 Fosfatasa alcalina (U/L) en vacas lecheras (primera gestación) .....	53
Figura No. 14 Alanina Aminotransferasa (U/L) en vacas lecheras (primera gestación).....	54
Figura No. 15 Aspartato Aminotransferasa (U/L) en vacas lecheras (primera gestación) ...	54
Figura No. 16 Gamma-glutamil transferasa (U/L) en vacas lecheras primera gestación .....	55
Figura No. 17 Glutati6n (U/L) en vacas lecheras primera gestaci6n.....	56
Figura No. 18 Transferasas de glutati6n (µmol/min/g) en vacas lechera primera gestaci6n	56
Figura No. 19 Respuesta inmunol6gica a Nc IgG <sub>1</sub> primera gestaci6n .....	59
Figura No. 20 Respuesta inmunol6gica a Nc IgG <sub>2</sub> primera gestaci6n .....	59
Figura No. 21 Respuesta inmunol6gica a Nc IgG primera gestaci6n.....	60
Figura No. 22 Respuesta inmunol6gica a NcGRA <sub>7</sub> primera gestaci6n .....	61
Figura No. 23 Respuesta inmunol6gica a NcSAG <sub>4</sub> primera gestaci6n.....	61
Figura No. 24 (A) Hepatitis linfoplasmositaria periportal multifoal, microscopio ocular a 10X, (B). Misma lesi6n vista en microscopio con ocular a 100X.....	62
Figura No. 25 Gel de agarosa al 2.5% con marcador molecular, y amplificaci6n en los 18 pozos, con 3 tejidos de 6 fetos abortados positivos .....	63
Figura No. 26 Resultados IFI en becerros precalostrales (A) control positivo (40X) (B) control negativo (40X) (C) muestra positiva de suero precalostr al (40X). .....	63
Figura No. 27 Concentraci6n de Aflatoxinas totales mediante ELISA (µg/kg) segunda gestaci6n (A) UPL 1 (B) UPL 2 .....	64
Figura No. 28 Tiempo de protrombina (seg) segunda gestaci6n (A) UPL 1 (B) UPL 2.....	65
Figura No. 29 Proteínas totales (g/L) segunda gestaci6n (A) UPL 1 (B) UPL 2 .....	65
Figura No. 30 Albúmina (g/L) segunda gestaci6n (A) UPL 1 (B) UPL 2.....	66
Figura No. 31 Fosfatasa alcalina (U/L) segunda gestaci6n (A) UPL 1 (B) UPL 2 .....	67
Figura No. 32 Alanina aminotransferasa (U/L) segunda gestaci6n (A) UPL 1 (B) UPL 2..	67
Figura No. 33 Aspartato aminotransferasa (U/L) segunda gestaci6n (A) UPL 1 (B) UPL 2 .....	68
Figura No. 34 Gamma-glutamil transferasa (U/L) segunda gestaci6n (A) UPL 1 (B) UPL 2 .....	69
Figura No. 35 Transferasas de glutati6n (µmol/min/g) segunda gestaci6n (A) UPL 1 (B) UPL 2.....	69

Figura No. 36 Glutación reducido (nmol/gr) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2 .....70

Figura No. 37 Respuesta inmunológica a Nc IgG<sub>1</sub> segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2  
.....71

Figura No. 38 Respuesta inmunológica a Nc IgG<sub>2</sub> segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2  
.....71

Figura No. 39 Respuesta inmunológica a Nc IgG segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2  
.....72

Figura No. 40 Respuesta inmunológica a Nc GRA<sub>7</sub> segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL  
2 .....73

Figura No. 41 Respuesta inmunológica a Nc SAG<sub>4</sub> segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL  
2 .....73

Figura No. 42 Respuesta inmunológica a INF- $\gamma$  segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2 74



**ÍNDICE DE CUADROS**

Tabla 1 Parámetros reproductivos primera gestación .....50  
Tabla 2 Seroconversión en vacas lecheras primera gestación .....51  
Tabla 3 Seroconversión en vacas lecheras segunda gestación .....63



## RESUMEN

**Factores biopatológicos presentes en bovinos Holstein expuestos naturalmente a aflatoxinas y *Neospora caninum*.** A nivel mundial la contaminación de los alimentos por aflatoxinas es un grave problema debido a la pérdida del alimento, disminución de sus parámetros nutricionales y por los efectos adversos asociados al consumo de alimento contaminado con este tipo de micotoxina. La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo llamado *Neospora caninum*, identificado por primera vez en perros en Noruega en 1984; en bovinos se reporta como una de las principales causas de fallo reproductivo en el ganado lechero y de carne en muchos países, causando considerables pérdidas económicas por la ocurrencia de abortos, atención profesional, diagnóstico de la enfermedad y pérdidas en la producción de leche. El objetivo del estudio fue identificar los factores inmunitarios y toxicológicos presentes en la exposición natural a la combinación de la infección por *Neospora caninum* y el consumo de aflatoxinas en el alimento de vacas Holstein y sus fetos abortados durante la primera y segunda gestación. Los sitios de muestreo fueron dos unidades productivas lecheras localizadas en la región del altiplano central mexicano, en los estados de Aguascalientes y Jalisco, en ambas unidades se seleccionaron 45 animales de los que se colectaron muestras mensuales de sangre para determinar el estado inmunológico ante la infección contra *Neospora* y de la ración total mezclada que para determinar la concentración de aflatoxinas en la dietas. Los resultados en conjunto muestran que las vacas infectadas con *Neospora caninum* y expuestas a mayores concentraciones de aflatoxinas en la dieta, tienen mayores probabilidades de presentar abortos durante la gestación o manifestar algún otro problema reproductivo antes o después de gestación; así como manifestar diversas alteraciones en la química sanguínea resultado de un proceso tóxico.

## ABSTRACT

**Biopathological factors present in Holstein cattle naturally exposed to aflatoxins and *Neospora caninum*.** Worldwide, the contamination of food by aflatoxin is a serious problem due to the loss of food, decrease in its nutritional parameters and the adverse effects associated with the consumption of food contaminated with this type of mycotoxin. Neosporosis is a parasitic disease caused by a protozoan called *Neospora caninum*, identified for the first time in dogs in Norway in 1984; in cattle it is reported as one of the main causes of reproductive failure in dairy and beef cattle in many countries, causing considerable economic losses due to the occurrence of abortions, professional attention, diagnosis of the disease and losses in milk production. The objective of the study was to identify the immunological and toxicological factors present in the natural exposure to the combination of the infection by *Neospora caninum* and the consumption of aflatoxins in the feed of Holstein cows and their aborted fetuses during the first and second gestation. The sampling sites were two dairy production units located in the region of the Mexican central highlands, in the states of Aguascalientes and Jalisco, in both units 90 animals were selected from which monthly samples of blood were collected to determine the immunological status before the infection against *Neospora* and the total mixed ration to determine the concentration of aflatoxins in the diets. The results together show that cows infected with *Neospora caninum* and exposed to lower aflatoxin concentrations in the diet are more likely to have abortions during pregnancy or to manifest some other reproductive problem before or after gestation; as well as manifesting various alterations in blood chemistry resulting from a toxic process.

## 1. INTRODUCCIÓN

A nivel global México aporta el 2.9% del total de leche bovina producida en el mundo (Carranza, et al., 2007). En México la agroindustria de lácteos y el sector destinado a la producción lechera generan 1.5 millones de empleos y aportan el 1.3% del producto interno bruto del país (García, et al., 2003). Sin embargo a nivel mundial las explotaciones pecuarias destinadas a la producción lechera se ven afectas por una amplia variedad de enfermedades parasitarias causantes de grandes pérdidas económicas debido a sus efectos colaterales que afectan la salud y que se ven reflejadas en las pérdidas económicas ocasionadas por ocasionar una disminución en la producción láctea e incrementar los costos de producción al tener que invertir en el tratamiento, prevención y control de dichos problemas (Quiroz, et al., 2009)

La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por un protozooario (*Apicomplexa, Sarcocystidae*) llamado *Neospora caninum*, identificado por primera vez en Noruega en 1984 en perros, los cuales manifestaban alternaciones neurológicas. *Neospora caninum* es un protozooario distribuido de manera mundial el cual posee un ciclo biológico indirecto, teniendo como hospederos definitivos a varios caninos entre ellos el perro, coyote, dingo y lobo gris, los cuales eliminan ooquistes infectantes en la heces, estos pueden ser consumidos por un gran número de hospederos intermediarios como ovinos, equinos, antílopes, roedores y bovinos, siendo en estos de mayor importancia debido a las pérdidas económicas ocasionadas en la producción a causa de la presencia de abortos, considerándose actualmente como uno de los principales agentes etiológicos causantes de abortos en bovinos lecheros (Dubey, et al., 2007).

Las aflatoxinas (AFs) son consideradas una de las micotoxinas más peligrosas, producidas como metabolitos secundarios de ciertos géneros de hongos toxicogénicos de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nominus*, que crecen en una gran variedad de alimentos, hasta el momento se tienen identificadas más de 20 diferentes tipos de aflatoxinas destacando principalmente las relacionadas con su potencial toxicológico como lo son la AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> siendo la AFB<sub>1</sub> la que posee un mayor efecto tóxico ya que al llegar al hígado es biotransformada y convertida en aflatoxina M<sub>1</sub> la cual es excretada por el animal a través de la leche siendo un peligro desde el punto de vista de la salud pública ya que esta leche es destinada para el consumo humano. Actualmente la AFB<sub>1</sub> está clasificada dentro del grupo

1 de la IACR (Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer) por su potencial carcinogénico, teratogénico y mutagénico además de ser una sustancia hepatotóxica, nefrotóxica e inmunosupresora (Williams, et al., 2004).

Ambos agentes etiológicos se encuentran presentes de manera habitual en la mayoría de los establos lecheros en los cuales se han identificado por separado los efectos adversos que ocasiona la presencia de ambos agentes patógenos en el animal (Dubey, et al., 2007).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 PRODUCCIÓN LECHERA

La leche es considerada una de las principales fuentes de alimento y de proteína para el ser humano, siendo así uno de los principales productos que conforman la canasta básica. Debido al gran número de factores que se ven involucrados a lo largo de toda la cadena productora de leche, los cuales comprenden desde la elaboración de los insumos requeridos en las explotaciones lecheras hasta su destino final que es el consumo de cada uno de los diferentes productos y subproductos lácteos; hacen que esta industria tenga una mayor importancia socioeconómica debido a la generación de múltiples fuentes de empleo. (Carranza, et al., 2009).

A nivel mundial la producción lechera se tiene estimada en 747 millones de toneladas producidas principalmente por los países miembros de la Unión Europea, India, Estados Unidos y Rusia la que en orden de importancia son los que aportan el 80.7% de la producción de leche de bovino en el mundo, mientras que México solo aporta el 2.9% (SAGARPA, 2015). Tal cantidad de producción de leche es generada por una población estimada a nivel mundial de 97.3 millones de cabezas de ganado lechero en donde el 77% de los animales se encuentran concentrados en países como India, Unión Europea, Rusia y México. México aporta el 7.0% del hato lechero a nivel mundial y con una productividad anual estimada en 1.4 toneladas por cabeza de ganado, cifra que resulta cuatro veces menor a la estimada en países más productivos y un consumo de leche estimado del 3.3 % de la producción mundial (Carranza, 2006).

Dentro de este contexto es importante mencionar que a nivel nacional el estado de Aguascalientes solo ocupa el 0.3% del territorio nacional y está catalogado en el lugar número 29 en base a su superficie territorial, pero con un promedio estimado en el 2014 de producción lechera de 384 millones de litros es decir el 3.45 % de la producción nacional tan solo con una población animal de 169 mil vientres (INEGI, 2007; SAGARPA, 2015).

## 2.2. AFLATOXINAS

### 2.2.1 Generalidades.

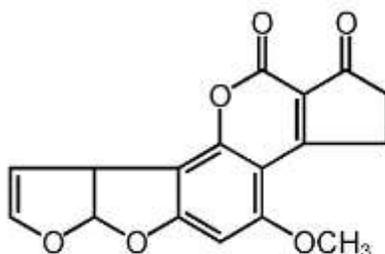
A nivel mundial la contaminación de los alimentos por aflatoxinas es un grave problema debido a la pérdida del alimento, disminución de sus parámetros nutricionales y por los efectos adversos asociados al consumo de alimento contaminado con este tipo de micotoxina, motivo por el cual es considerado de suma importancia la determinación y cuantificación de estos metabolitos (Johnson, et al., 2002). Se estima que el 25 % de los alimentos producidos mundialmente se encuentran contaminados con algún tipo de micotoxina, siendo mayor este problema en países en vías de desarrollo depende (Jaramillo, et al., 2009).

El término de micotoxina fue adoptado en la década de los 60 cuando se dio la muerte repentina de más de 100,000 pavos tras la ingestión de harina contaminada con aflatoxinas (Black, et al., 1992). Las micotoxinas son consideradas metabolitos secundarios de ciertos géneros de hongos como: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* los cuales pueden colonizar y contaminar los diferentes cultivos ya sea antes, durante o después de la cosecha (Carrillo, 2003 ). La existencia de estos hongos en el alimento no es indicativo de la presencia de micotoxinas, ya que para generar estos metabolitos es necesario la interacción de ciertos factores físicos y ambientales (actividad de agua, temperatura, humedad, presencia de oxígeno, sustrato, pH, aireación y luz pueden) que generen un medio propicio para la producción de estos metabolitos (Oude & Driehuis, 2001).

La presencia de estos hongos ha sido reportada en diferentes tipos de alimentos (maíz, cebada, trigo, avena, sorgo, ensilados, arroz, centeno y mijo), en cereales se ha estimado que entre el 30-45% se encuentran contaminados con algún tipo de micotoxina (Newman, 1998). Actualmente se han identificado más de 300 tipos micotoxinas; siendo de mayor relevancia por su potencial toxicológico la ocratoxina, zearalenona, aflatoxina, vomitoxina, fumonisina, deoxinivalenol (Roigé, et al., 2009 ).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios de diferentes especies de hongos pertenecientes al género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus*), esta micotoxina se puede encontrar contaminando una gran variedad de alimentos como lo son: el maíz, trigo, avena, arroz, algodón, soya, sorgo, frijoles, pasas, cacahuates, aceites, espaguetis, higos, salchichas, tortillas, queso y leche (García & Cotty, 2006.).

Dentro del grupo de las aflatoxinas se tienen identificadas 18 variedades de aflatoxinas (AF) entre las cuales se encuentran la AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>; siendo la AFB<sub>1</sub> una de las más importantes por su potencial toxicológico (Betina, 1994; Figura 3). La IACR tiene clasificada actualmente a la AFB<sub>1</sub> dentro del grupo I debido a su potencial carcinogénico en seres humanos y animales; además de ser consideradas sustancias hepatotóxicas, nefrotóxicas, teratogénicas, mutagénicas e inmunosupresoras (IARC, 1993; IARC, 2002).



**Figura No. 1 Estructura química de la AFB<sub>1</sub> (Palumbo & O'keeffe, 2008).**

Diferentes estudios indican que la contaminación del maíz con aflatoxina se asocia principalmente a la etapa de almacenamiento y no al cultivo del forraje (Bucio, et al., 2001; Reyes-Velazquez, et al., 2008). Se ha reportado que las AF reducen el crecimiento del ganado e incrementan los requerimientos de proteína en la dieta (Butkeraitis, 2008), además de generar manifestaciones clínicas como anorexia, decaimiento, menor ganancia de peso, disminución en la producción láctea (Pittet, 1998).

### **2.2.2 Contaminación del ensilaje**

La industria pecuaria destinada a la producción lechera formula las dietas de los animales mediante la utilización de pastos, granos, ensilaje, concentrado y algunos otros aditivos, debido a que la formulación de raciones balanceadas y de alto valor nutricional se ve reflejado en la producción láctea (Molina, et al., 2004). Por tal motivo es importante que el manejo de los alimentos desde el momento de la cosecha hasta el almacenamiento sea de la manera más óptima ya que un mal manejo de este proceso puede generar la contaminación de los alimentos y su disminución en sus valores nutricionales (Johansson, et al., 2000; Garon, 2006). A nivel mundial el ensilaje de maíz forma parte integral de la dieta de los bovinos, por lo cual gran parte de los cultivos de maíz en América son destinados para la elaboración de

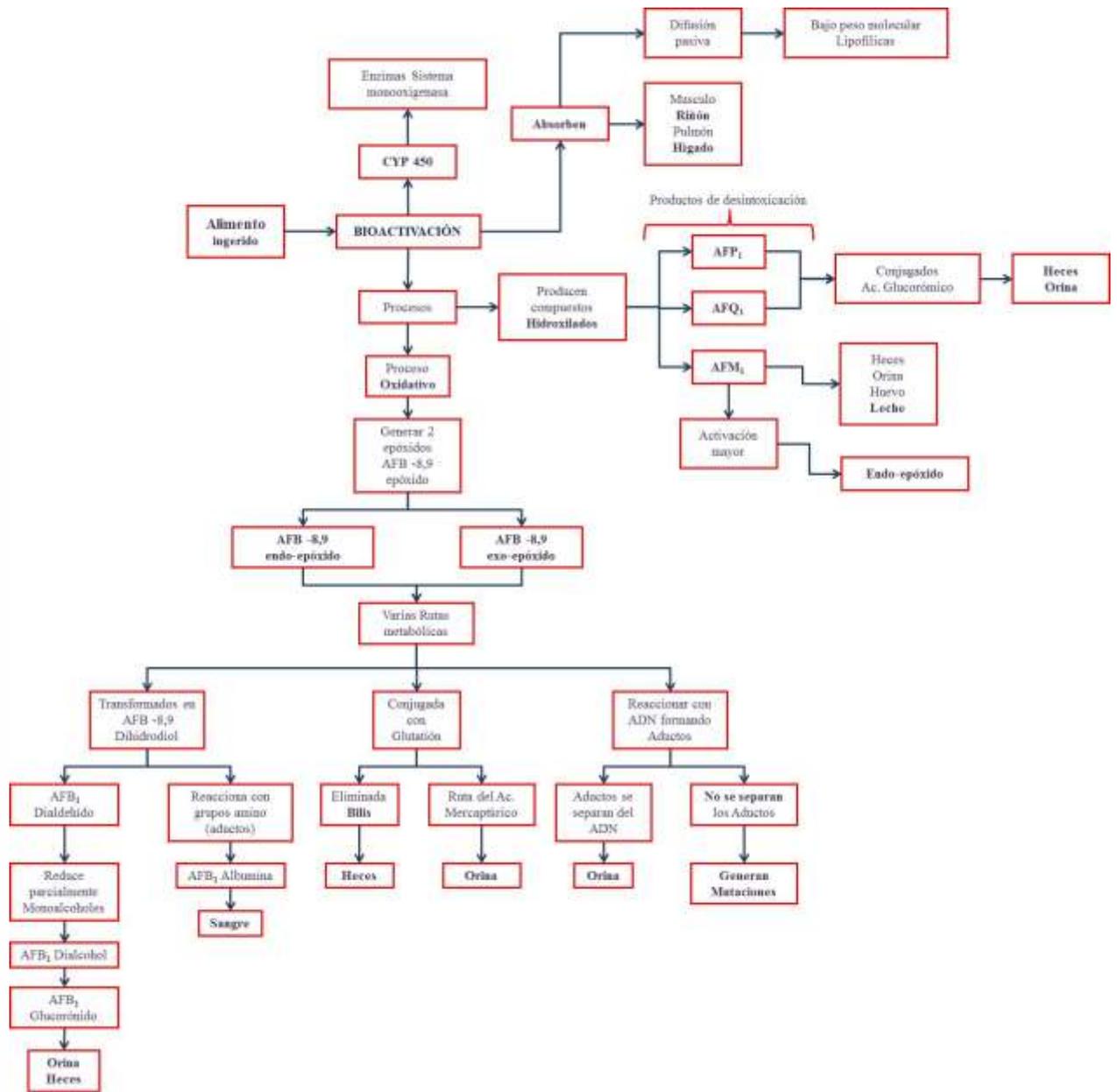
ensilaje de maíz (Reyes-Velazquez, et al., 2008). El proceso de elaboración del ensilaje se fundamenta en un almacenamiento anaeróbico de alimento y una disminución de pH por medio de una fermentación natural y la producción bacteriana de ácido láctico. (Torres-Pacheco, 2011).

Una de las principales causas de contaminación del ensilaje es la presencia de hongos toxicogénicos, favorecidos por alteraciones en el proceso de fermentación, siendo factores de riesgo la presencia de oxígeno, pH alcalino, almacenamiento deficiente, exceso de humedad o sequedad, filtración de agua y plagas (Teimouri, et al., 2004). Cada uno estos factores juega un papel importante y su evaluación indica la condición del ensilaje (Driehuis & Oude, 2001). Las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de hongos del genero *Aspergillus*, así como para la producción de sus micotoxinas es mediante temperaturas entre los 25–28 °C con un pH entre 3-10 (Reyes-Velazquez, et al., 2008).

### **2.2.3. Biotransformación**

Las aflatoxinas que se encuentran contaminando naturalmente el alimento son inocuas para el organismo, más sin embargo al ser ingeridas son absorbidas rápidamente en el tracto gastrointestinal y biotransformadas por un grupo de isoenzimas del citocromo CYP-450 en el hígado, formando epóxidos altamente reactivos que son distribuidos a diversos tejidos (musculo, pulmón y riñón) como metabolitos tóxicos (Jaramillo, et al., 2009; Marin, et al., 2013).

Este proceso de bioactivación se inicia cuando estas enzimas adicionan grupos funcionales a la aflatoxina y originan compuestos hidroxilados (AFM<sub>1</sub> y AFQ<sub>1</sub>) o desmetilados (AFP<sub>1</sub>) que al conjugarse con ácido glucorómico son eliminados del organismo mediante las heces, orina, huevo y leche (figura 4; Jaramillo, et al., 2009).



**Figura No. 2** Proceso de biotransformación de las aflatoxinas  
*(Elaboración propia con datos de (Palumbo & O’keeffe, 2008)).*

Una ruta metabólicas de destoxificación es mediante un proceso oxidativo que da como resultado la generación dos diferentes epóxidos (AFB-8,9 endo-epóxido y AFB-8,9 exo-epóxido), los cuales siguen varias rutas para su eliminación, en donde pueden ser transformadas en AFB<sub>1</sub> dihidrodiol y para posteriormente ser reducido a AFB<sub>1</sub> dialdehído, que al entrar en contacto con la lisisna puede formar aductos con este tipo de proteínas o reducir parcialmente sus monoalcoholes. Otra de sus vías de eliminación es por su

conjugación con glutatión o ácido mercaptúrico para ser eliminado tanto en heces como orina; existiendo el riesgo de que la AF pueda reaccionar con secuencias de ADN y formar aductos (Jaramillo, et al., 2009).

#### **2.2.4 Signos y lesiones**

En bovinos se han observado entre las principales manifestaciones clínicas en una aflatoxicosis la presencia de ictericia, diarrea, pérdida de apetito, depresión, adinamia, prolapso rectal, edemas, disminución en la producción, abortos, problemas renales e inmunosupresión (Upadhaya, et al., 2009). El daño generado por la acción de las aflatoxinas en el hígado desencadena la presencia de hemorragias al incrementarse la fragilidad de los capilares, disminución en los factores de coagulación y síntesis de proteínas además de un incremento en la actividad enzimática específica hepática (Marinho, et al., 2007). Dubey et al. (2007) ha sugerido que la presencia de aflatoxinas en el alimento de ganado lechero es un factor de riesgo para fallas reproductivas ya que estos compuestos causan inmunosupresión, permitiendo la reactivación de agentes patógenos causantes de aborto y desordenes reproductivos. En este sentido diferentes autores sugieren que la exposición constante a bajas concentraciones ocasiona cambios patológicos en la inmunidad, metabolismo y sistema endocrino del animal. (Queiroz, et al., 2012; Marin, et al., 2013).

Las manifestaciones toxicológicas de la aflatoxicosis se pueden presentar en dos diferentes formas dependiendo de su tiempo de exposición. La intoxicación aguda se caracteriza por producir daños directos en el hígado y la subsecuente enfermedad o muerte, está manifestación relacionada con la ingesta de altas concentraciones de AF y su manifestación clínica incluye la necrosis hemorrágica del hígado, edema, decaimiento y cirrosis hepática (Steyn, 1995). La forma crónica es originada por la exposición a dosis acumulativas y constantes, donde los efectos negativos repercuten principalmente a nivel nutricional, inmunológico, productivo y en la síntesis de proteínas (Williams, et al., 2004).

Gran parte de los efectos tóxicos producidos por las aflatoxinas son derivados de la biotransformación en cada uno de sus diferentes metabolitos AFM<sub>1</sub>, AFP<sub>1</sub>, AFQ<sub>1</sub>, al ser ingerida la aflatoxina, en ganado destinado a la producción de carne se ha encontrado que la ingestión de aflatoxinas en la dieta hace que se incrementen los requerimientos de proteína

en el alimento y el retraso en el crecimiento de los animales (Maragos, et al., 1996; Maragos & Busman, 2010).

La ingestión de aflatoxinas ha sido asociada con la presencia de neoplasias en pulmones, riñón, colón e hígado así como inmunodepresión y muerte (Dzidic, et al., 2006).

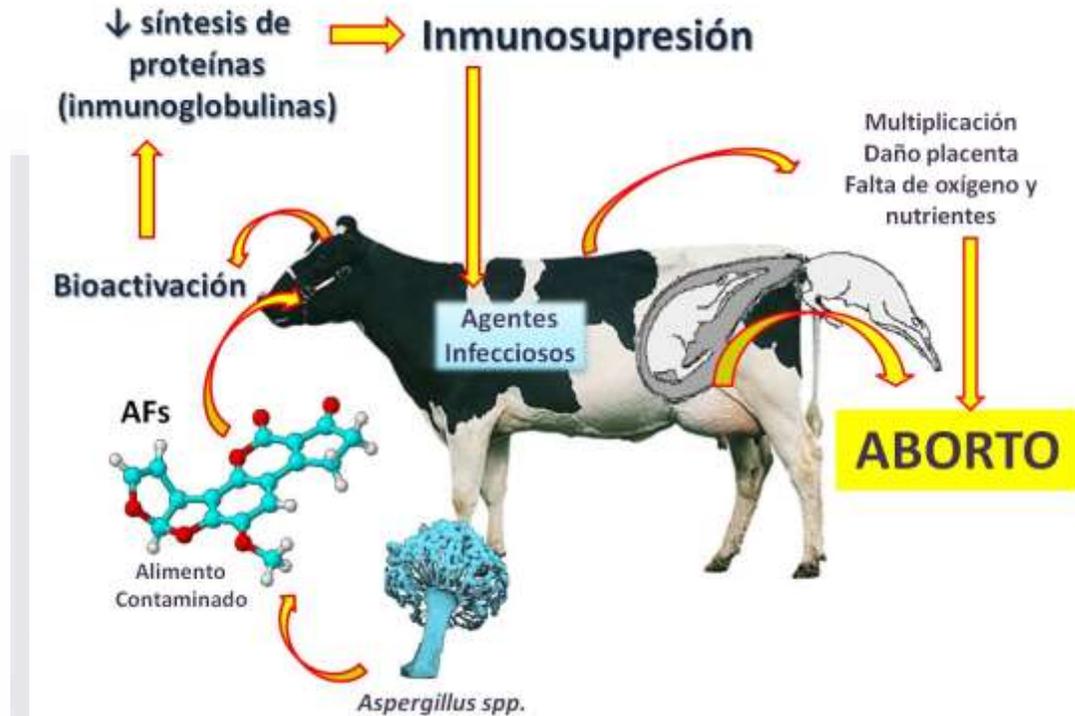


Figura No. 3 Posible interacción entre la ingestión de aflatoxinas y la infección por *Neospora caninum* en vacas gestantes (Fuente propia)

### 2.2.5 Detección y cuantificación

Actualmente las técnicas más utilizadas para la detección y cuantificación de aflatoxinas son la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y la Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), debido a su elevada confiabilidad en los resultados (Maragos & Busman, 2010).

Para la correcta cuantificación de AF es necesario realizar de manera adecuada el muestreo, extracción, purificación, detección y cuantificación de AF; el procedimiento a realizar para la obtención y preparación de la muestra depende del tipo de alimento y técnica a realizar (Johansson, et al., 2000). Durante la extracción y purificación se migra el analito hacia un disolvente para eliminar todos los compuestos de interferencia por medio de una serie de columnas de limpieza, ya sea mediante su extracción en fase sólida o por técnicas de

inmunoafinidad en donde sólo el analito a examinar es retenido en la para su detección (AOAC, 2005).

La HPLC es considerada la técnica más certera para la determinación y cuantificación de aflatoxinas debido a su alta sensibilidad. Durante el análisis de las muestras se utilizan dos diferentes fases; una fase líquida móvil o disolvente que tiene por objetivo mover la muestra a través una columna donde el analito es separado de los demás compuestos (AOAC, 1995). La detección se logra mediante el uso de un detector de luz ultra violeta (UV) o de fluorescencia (FLD) mediante la detección de la emisión de luz (435 nm) a partir de moléculas que han sido excitadas a niveles más altos de energía y que da como resultado un cromatograma, en donde en el eje X está representado el tiempo de retención y en el eje de las Y los niveles de cuantificación (Johnson, et al., 2002).

Las técnicas ELISA se fundamentan en métodos inmunológicos que buscan las afinidades monoclonales o policlonales de los anticuerpos hacia las aflatoxinas, estas pruebas basadas en anticuerpos se encuentran disponibles en el mercado y son capaces de brindar resultados confiables en un muy poco tiempo; en los Kits de ELISA competitivos los anticuerpos específicos para la aflatoxinas se encuentran recubriendo los pozos donde se añadirán cada una de las muestras, después de un tiempo de incubación se añade un conjugado el cual compite junto con la aflatoxina por los sitios en los cuales hay anticuerpos contra aflatoxinas en los pocillos, posteriormente se realiza un lavado para eliminar todo el conjugado enzimático no unido mientras que el que quedó unido se convierte en un cromógeno al cual se añade una solución de interrupción para detener dicha reacción; finalizado este paso se procede a la medición por medio de espectrofotometría a 450 nm en un lector de ELISA donde la absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina existente en la muestra, la lecturas de absorbancia en el lector de ELISA lo que hacen es calcular la absorbancia en porcentaje. Para soluciones estándar, la absorbancia se compara con la concentración de aflatoxina para obtener una curva de calibración (Lee, et al., 2010)

### **2.2.6 Métodos de control de micotoxinas**

Se refiere al conjunto de tratamientos posteriores a la cosecha dirigidos a eliminar o reducir los efectos tóxicos de las micotoxinas en los animales, cuyo fundamento principal de estos métodos de control es inactivar, eliminar o reducir la biodisponibilidad de las micotoxinas

presentes en los productos agrícolas e impedir que se lleve a cabo el crecimiento de hongos y los efectos colaterales asociados a la producción de micotoxinas (Armando, et al., 2012), estos métodos se dividen en tres diferentes categorías según su naturaleza y mecanismo de acción: métodos químicos, físicos y biológicos (Charmley & Prelusky, 1994; Marinho, et al., 2007).

Los métodos químicos se basan en la destrucción o inactivación de la aflatoxina mediante la alteración de su estructura por medio de solventes orgánicos como el etanol al 95% y acetona 90% o mediante la utilización de sustancias químicas entre las cuales se encuentran el hexano-etanol, peróxido de hidrógeno, hidróxido de amonio, hipoclorito de sodio y ácido propiónico que buscan convertir a las micotoxinas en compuestos menos tóxicos o inactivarlas (Armando, et al., 2012).

Entre los métodos físicos se encuentran la inactivación por calor (presión de vapor, tratamiento por microondas, la nixtamalización), inactivación por la luz (radiación ultravioleta y radiación gamma), la eliminación por adsorbentes (zeolitas, clinoptilolitas y aluminosilicatos) la eficacia de estos absorbentes depende de su estructura química y del tipo de toxina, debido a que cada absorbente tiene afinidad hacia un tipo o cierto grupo de micotoxinas (Scudamore & Livesey, 1998; González, et al., 2008; Takayama, et al., 2005).

Los adsorbentes pueden ser divididos en dos grupos: las clinoptilolitas y los adsorbentes con principio orgánico (adsorbentes con enzimas, productos derivados de levaduras o carbón activado), diversos estudios han demostrado su elevado potencial de adsorción de diferentes tipos de micotoxinas (Piva, et al., 1995; Ramos & Hernández, 1997; Scott, 1998; Huwig, et al., 2001; Galvano, et al., 2001).

Las clinoptilolitas multilaminares poseen la capacidad de adsorber agua y ciertas moléculas hidrosolubles en el espacio interlaminar y desencadenando una expansión de la arcilla, esta característica hace que estos materiales posean una importante capacidad de adsorción y una escasa selectividad; estas arcillas, contienen en su estructura canales conocidos como tamices moleculares, los cuales contienen agua y cationes alcalinos de compensación e intercambio. Cuando estos canales están libres de agua, sus propiedades de adsorción aumentan (Phillips, et al., 1995; Phillips, et al., 1996; Galvano, et al., 2001).

El fundamentado principal de un programa de control biológico consiste en promover la presencia de ciertos microorganismos que controlen o inhiban el crecimiento del hongo

toxicogénico o de sus metabolitos, dentro de estos microorganismos uno de los más utilizados es *Sacharomyces cerevisiae* el cual posee una capacidad de adsorción por medio de hidratos de carbono contenidos en su pared celular con la propiedad de adherir micotoxinas (Dogi, et al., 2011).

Otra de las estrategias más comunes para controlar la contaminación por aflatoxinas es establecer los niveles máximos de residuos (LRM) o niveles de acción para la AF, que son las concentraciones máximas permitidas de aflatoxina en alimentos (FAO, 2004). La Comisión Europea ha fijado 5 µg/kg de AF en alimento para vacas lecheras; Sin embargo, en muchos países como Estados Unidos y México (FAO, 2004), el LMR se fija en 20 µg/kg para AF en los alimentos para ganado lechero. A pesar de que estas regulaciones están destinadas a proteger la salud humana y evitar la toxicidad en animales, existen pocas evidencias del efecto que una exposición prolongada a bajos niveles de AF podría tener en la salud animal; que parece ser el tipo más representativo de exposición en el campo (Reyes-Velázquez, et al., 2009).

### **2.2.7 *Sacharomyces cerevisiae* características**

Es un microorganismo que ha sido añadido de manera funcional como probiótico a los alimentos de los animales, debido que posee la capacidad de prevenir enfermedades infecciosas derivado de su efecto quimioprotector, promover un mayor aporte y utilización de vitaminas del complejo B, minerales y proteínas. En vacas lecheras se ha reportado que el consumo de esta levadura propicia un incremento en la producción de leche debido a un incremento en la actividad de la microflora ruminal que permite una mayor biodisponibilidad de los forrajes (Dogi, et al., 2011).

Se ha reportado que esta levadura tiene la capacidad de unirse a AFB<sub>1</sub> en un medio salino (PBS, pH 7) e impedir de esta manera su bioactivación (Armando, et al., 2012). El mecanismo de acción relacionado a la unión de las micotoxinas con la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* es toda vía escasa, sin embargo se sabe que existe una correlación entre la cantidad β-D-Glucanos contenidos en la pared celular y su eficacia en absorción de zearalenona, AFB<sub>1</sub>, deoxinivalenol y ocratoxina (Armando, et al., 2012) ya ha sido demostrada en donde además se ha encontrados que es capaz de biodegradar in vitro a AFB<sub>1</sub>

dicho estudio siguiere la existencia de más de un solo mecanismo involucrado para la biodegradación de estas micotoxinas involucrados (Gallo & Masoero, 2010).

Diferentes estudios señalan que los cambios de pH y la presencia de bilis son condiciones que las levaduras encuentran durante su paso a través del tracto gastrointestinal y que sobretodo *S. cerevisiae* debe hacer frente a estas y más características del tracto digestivo para poder adsorber aflatoxinas y mantener su capacidad de unión a la micotoxina (Dogi *et al.*, 2011).



## 2.3 NEOSPOROSIS

### 2.3.1 Definición

La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por un protozooario llamado *Neospora caninum*, identificado por primera vez en perros en Noruega en 1984, los cuales manifestaban principalmente alternaciones neurológicas, pero fue hasta el año de 1988 donde se logró identificar este protozooario en perros mediante su aislamiento *in vitro* en tejidos; dándole así su clasificación taxonómica actual (Dubey, et al., 2007; Yu, et al., 2009).

### 2.3.2 Agente etiológico

*Neospora caninum* es un protozooario intracelular perteneciente al phylum *Apicomplexa* de la familia *Sarcocystidae* (Dubey, et al., 2007).

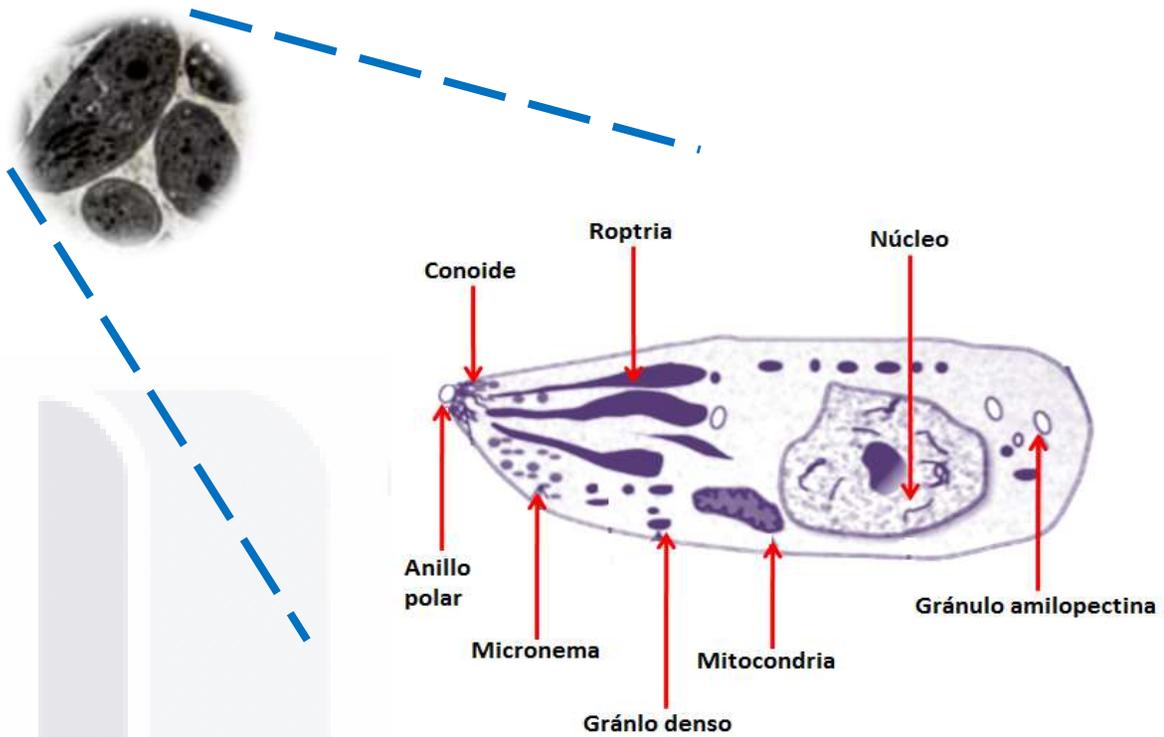
### 2.3.3 Hospederos

*Neospora caninum* es un protozooario distribuido mundialmente el cual posee un ciclo biológico indirecto, teniendo como hospederos definitivos a varias especies de caninos entre ellos el perro, coyote, dingo y lobo gris; los cuales eliminan ooquistes infectantes en la heces, estos pueden ser consumidos por un gran número de hospederos intermediarios como lo son ovinos, equinos, antílopes, rinocerontes, roedores y bovinos, siendo en estos de mayor importancia debido a las pérdidas económicas ocasionadas por una disminución en la producción y la presencia de abortos, este protozooario es considerado actualmente como uno de los principales agentes etiológicos causantes de abortos en bovinos lecheros. Aunque la neosporosis actualmente no es considerada una zoonosis, si ha sido posible infectar de manera experimental a primates sugiriendo una potencial interacción y fuente de infección con el hombre (Dubey, 2003; Dubey, et al., 2007; Almberg, et al., 2009).

### 2.3.4 Fases evolutivas y localización

La localización de este parásito dentro del organismo es variada y diferente entre hospedero definitivo e intermediario, de lo cual depende cada una de las diferentes fases evolutivas que se generan a lo largo de su ciclo biológico encontrándose dentro de los hospederos intermediarios dos diferentes fases extraintestinales y de reproducción asexual de este

parásito como lo son taquizoitos (fases de reproducción rápida) de forma ovoide, semilunar o globular dependiendo la etapa de división en la que se encuentren y con un tamaño promedio de entre 5-7  $\mu\text{m}$  de largo por 1-2  $\mu\text{m}$  de ancho, una membrana plasmática de 3 capas y un complejo apical compuesto de 22 microtúbulos, 2 anillos apicales, un conoide y un anillo polar; además de contener varios organelos existentes en otros protozoarios Apicomplexa como son los micronemas, roptrías y gránulos densos entre otros, los taquizoitos pueden invadir una gran variedad de células nucleadas del organismo para posteriormente involucrarse en una vacuola parasitófora donde se reproducen rápidamente por endodiogenia; sin embargo al penetrar dentro de la célula a veces son generados bradizoitos (Fase de reproducción lenta) que se encuentran contenidos dentro de quistes tisulares que pueden llegar alcanzar un tamaño de hasta 100  $\mu\text{m}$  dependiendo del número de bradizoitos contenidos en su interior y con un tamaño aproximado de 8  $\mu\text{m}$  de largo por 2  $\mu\text{m}$  ancho (Camarillo, et al., 2002). Ambos estadios se encuentran ubicados en diferentes tejidos y órganos del animal contenidos en el interior de las células llegando a infectar células endoteliales, miocitos, macrófagos, neuronas y hepatocitos entre otros; en órganos como riñón, hígado, bazo, pulmón y piel, a consecuencia de la liberación de los taquizoitos después de la lisis celular son diseminados a todo el organismo a través de la circulación sanguínea logrando invadir más tejidos (Dubey, et al., 2006; Ortega-Mora, et al., 2007; Sohn, et al., 2011).



**Figura No. 4** Estructura de un taquizoíto de *Neospora caninum* (adaptado de Aguado-Martínez, et al., 2005).

En el hospedero definitivo encontramos las fases catalogadas como intraintraestinales que se llevan a cabo dentro del tracto digestivo, aunque actualmente no se han identificado la mayoría de las formas involucradas en la fase intestinal presentes en este hospedero, sin embargo se tiene identificado la presencia de ooquistes infectantes con un tamaño promedio de 10-15  $\mu\text{m}$  en heces de caninos (Razmi, 2009), dentro de cada uno de estos ooquistes se ha identificado la presencia de dos esporoquistes que contiene 4 esporozoítos cada uno y que son generados mediante la etapa de esporogonia; a diferencia de lo que sucede en el ciclo biológico de otras coccidias, en la fase intestinal de *Neospora caninum* toda vía no se han logrado identificar las etapas de esquizogonia y gametogonia aunque se mantiene la teoría de que son las que preceden a la formación del ooquiste (Dubey, et al., 2007).

Es importante mencionar que también los perros también pueden actuar como hospederos intermediarios donde la neosporosis se puede manifestar en forma sistémica y localizarse en su fase extraintestinal de igual modo que en otros hospederos intermediarios (Dubey & Schares, 2006; Ortega-Mora, et al., 2007).

### 2.3.5 Ciclo Biológico

El ciclo biológico de *Neospora caninum* se puede empezar a describir por medio de la ingestión tejidos infectados con quistes tisulares por parte de un canino donde por medio de diferentes mecanismo bioquímicos presentes en el tracto digestivo son destruidos y dejados en libertad los esporozoitos que se establecerán a nivel intestinal de su hospedero definitivo el perro, dentro del cual completará ciertas etapas de su fase intrainestinal, de las cuales a pesar de que se desconocen ciertas etapas se tiene la teoría que al igual que sucede en el ciclo biológico de otras coccidias este parásito también cursa por las etapas de esquizogonia y gametogonia, etapas previas y necesarias para dar origen a una nueva generación de estos protozoarios mediante la formación del ooquiste infectante de *Neospora* que será nuevamente eliminado con la heces y que contaminarán el agua y alimento de sus hospederos intermediarios ( Dubey, et al., 2007; Razmi, 2009; Conzuelo, et al., 2011).

Para que se lleve a cabo de manera completa el ciclo biológico es necesaria la ingestión de ooquistes infectantes por parte de sus hospederos intermediarios, dentro de los cuales se localizan dos estadios de reproducción asexual que permiten la diseminación y el establecimiento del parásito dentro del organismo (Ortega-Mora, et al., 2007). Los taquizoitos son capaces de invadir de forma activa una gran variedad de células nucleadas de diferentes tipos de tejidos como son, músculo, cerebro, corazón, hígado, pulmón, riñón, piel, placenta, etc. una vez en el interior de una célula se envuelven en una vacuola parasitófora donde se reproducen rápidamente por endodiogenia, para producir una nueva generación de varios cientos de taquizoitos infectantes que son liberados al organismo después de causar la lisis de la célula, donde una vez libres los taquizoitos son capaces de invadir células circunvecinas o diseminarse por medio del torrente sanguíneo a todo el organismo e infectar otras células y tejidos de organismo, tomando principalmente importancia en vacas gestantes debido a que el parásito por vía sanguínea realiza una migración transplacentaria llegando a infectar al feto con una tasa de transferencia del 90% que se va incrementando al ir avanzando la gestación del animal (Dubey, et al., 2006).

A pesar de que el sistema inmune del animal lucha activamente para controlar la infección y a los taquizoitos circulantes en sangre, algunos taquizoitos alcanzan a penetrar e invadir una célula en donde empiezan un fase de reproducción lenta dentro de un quiste tisular localizado

en diversos tejidos el cual contiene en su interior nuevos estadios llamados bradizoitos, los cuales se encuentran protegidos dentro de este quiste tisular de cualquier respuesta o acción de sistema inmunológico evitando así su destrucción y ocasionando el establecimiento de la enfermedad de manera crónica en los animales infectados; el proceso de la destrucción de los quistes tisulares y la liberación de los bradizoitos al organismos se tiene reportado que está ligado a diferentes factores inmunodepresores que propician la liberación de estos bradizoitos y la reactivación de la neosporosis en el animal (Dubey, et al., 2007).

El hospedero definitivo se infecta al consumir carne contaminada con quistes tisulares ubicados en diferentes tejidos del hospedero intermediario, dando origen a una nueva fase enteroepitelial del ciclo de este protozooario y la posterior eliminación de ooquistes infectantes en las heces de los caninos (Dubey, et al., 2007; Razmi, 2009).

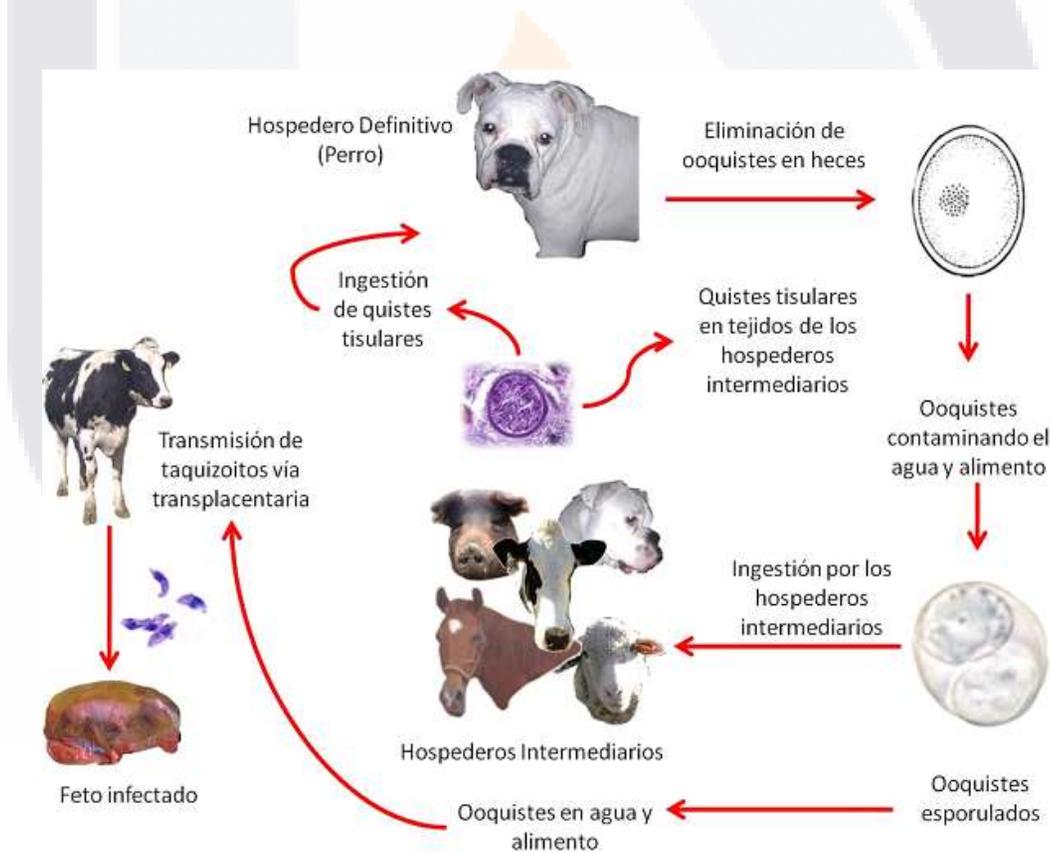


Figura N° 2.

Figura No. 5 Ciclo biológico *Neospora caninum* (elaboración propia con datos de Dubey *et al.*, 2007)

### 2.3.6 Vías de transmisión

En el ganado se tienen identificadas dos diferentes vías de transmisión de neosporosis a las cuales se le atribuye la diseminación de la enfermedad dentro de las explotaciones lecheras. La primera de ellas es la transmisión transplacentaria (vertical o endógena) que consiste en la transmisión del protozooario en vacas con una infección crónica a sus crías en el útero, debido a la migración de bradizoitos reactivados dentro de los quistes tisulares presentes en los tejidos de la madre favorecidos o estimulados por una disminución en la protección mediada por células del sistema inmunológico lo cual ayuda a la recrudescencia de la enfermedad y a su posterior migración e invasión por medio del torrente sanguíneo hacia la placenta originando así la infección del feto, este mecanismo es considerado el de mayor importancia en bovinos ya que su índice de transmisión Madre-Feto se encuentra en un promedio del 90% lo cual garantiza que el parásito sea transmitido a la nueva descendencia, siendo también identificado este mecanismo en especies como caninos, felinos, roedores y ovinos, por mencionar algunos (Muhammet, et al., 2011; Rosbottom, et al., 2008).

La segunda vía identificada es la transmisión horizontal en la que el ganado adquiere la infección tras la ingestión de ooquistes infectantes esporulados que se encuentran contaminando el agua o alimento de los animales, actualmente solo ha sido identificado la transmisión de vacas con una infección crónica a su progenie durante varias generaciones, sin embargo el contagio vaca a vaca no ha sido comprobado; así mismo se sabe que *Neospora caninum* puede ser excretado por la vía galactogénica, descargas uterinas y semen del ganado infectado aunque no se considera que estas vías sean importantes para la diseminación de la enfermedad ya que el número de parásitos presentes en estos fluidos es infrecuente (Dubey, et al., 2007; Muhammet, et al., 2011).

Entorno a la neosporosis y su interacción entre hospederos definitivos e intermediarios así como factores predisponentes para transmisión de la enfermedad han sido identificados diferentes factores de riesgo asociados con este problema parasitario entre los cuales se tiene ya observados que la presencia de perros en los establos, la contaminación del alimento del ganado con materia fecal de caninos infectados, el agua, época del año, el clima, número de animales existentes en la explotación, el uso comunal de los potreros para el ganado, la presencia de retenciones placentarias mayores al 10% en gestaciones previas, origen de los animales de remplazo en el hato, presencia de anticuerpos contra otros agentes infecciosos,

alimentación con calostro a los becerros y la alimentación del ganado a base de ensilaje de maíz contaminado con hongos durante el verano, todos esos factores son considerados de riesgo y capaces de llegar a desencadenar o activar la enfermedad (Bartels, et al., 1999; Medina, 2008; Figura 2).

### **2.3.7 Signos Clínicos**

La manifestación clínica en los animales es variada y principalmente depende del tipo de hospedero que se vea infectado, en caninos la presentación sistémica de la enfermedad se manifiesta mediante signos clínicos asociados con problemas neurológicos entre los cuales se encuentra una paresia flácida de uno o ambos miembros posteriores y subsecuentemente los miembros anteriores también se ven afectados a consecuencia de una parálisis progresiva con una posterior atrofia muscular, parálisis de la mandíbula, disfagia y pérdida progresiva de los reflejos oculares (Dubey, et al., 2007; Yu, et al., 2009).

En bovinos el signo clínico principal y más evidente es la presencia de abortos esporádicos o endémicos, que se presentan durante los últimos dos tercios de la gestación, siendo durante el 5° y 6° mes donde se presentan el mayor índice de abortos con un cierto grado de autólisis o momificación; aunque gran parte de los fetos infectados congénitamente llegan a término su gestación y nacen clínicamente sanos pero como portadores latentes de la enfermedad, existe la probabilidad de que algunos becerros nacidos infectados vía congénita manifiesten signos clínicos neurológicos asociados con las lesiones producidas en el sistema nervioso, las cuales pueden ir desde una ligera parálisis de los miembros anteriores y/o posteriores, escoliosis, hidrocefalia y un estrechamiento la luz del canal medular (Dubey, et al., 2006; Dubey, et al., 2007; Ortega-Mora, et al., 2007).

Los abortos ocasionados por neosporosis pueden ser considerados como resultado de la reactivación de la enfermedad crónica en las madres e inducida por una pérdida de la inmunidad durante la gestación que propicia la reactivación de los bradizoitos enquistados en los tejidos (Bartels, et al., 1999). Diversos autores señalan que la ingestión de micotoxinas presentes en el alimento del ganado principalmente a base de ensilaje es un factor de riesgo que desencadena la enfermedad debido al efecto inmunodepresor y estrogénico que generan ciertos tipos de micotoxinas; las vacas infectadas con *Neospora caninum* en forma latente

tiene entre 2-3.5 más probabilidades de abortar a comparación de vacas no infectadas (Dubey, et al., 2007; Ghanem, et al., 2009; Queiroz, et al., 2012).

### **2.3.8 Importancia Económica**

La neosporosis es una de las principales causas de fallo reproductivo en el ganado lechero y de carne en muchos países, causando considerables pérdidas económicas por la ocurrencia de abortos, atención profesional, diagnóstico de la enfermedad y pérdidas en la producción de leche. Dubey, et al., (2007) señala que los costos involucrados por la pérdida del feto son muy variables y dependen principalmente de la edad, valor genético de la cría y de la madre, así como las pérdidas en la producción de nuevas crías.

Respeto a la producción láctea se sabe que las pérdidas económicas son de consideración ya que diferentes estudios han demostrado esta disminución en la producción en vacas seropositivas a *Neospora caninum*, en un estudio realizado en Estados Unidos en un hato con una población de 2000 vacas encontró una diferencia en la producción aproximadamente de 1 kg de leche menor en vacas seropositivas en relación con vacas no infectadas (Thurmond, et al., 1995), datos similares a los obtenidos en otro estudio realizado en un hato con una población de 700 vacas donde se reportó neosporosis una disminución en la producción de entre el 3 y 4% de la producción láctea, con un costo promedio de 128 dólares por vaca por lactancia (Hernández, et al., 2001). Otros estudios indican que este efecto en la producción se mantiene principalmente en vacas seropositivas durante los primeros 100 días en producción, en explotaciones donde es común la presencia de abortos y la disminución en la producción durante la primera gestación sin que se conozca realmente el verdadero efecto fisiopatológico generado en la producción de leche (Bartels, et al., 1999). Las pérdidas asociadas a la producción de carne debido a la disminución en la ganancia de peso diario equivalen a 15.62 dólares por ternero, sin embargo la verdadera pérdida económica causada por neosporosis es debido a la presencia de abortos en donde el costo varía dependiendo el valor genético de la cría abortada (Barling, et al., 2000), solamente en el estado de California en Estados Unidos se ha estimado que la pérdida económica producida generado en 40 000 abortos debidos a *Neospora caninum* equivalen a 35 millones de dólares anuales (Bartels, et al., 1999), en Suiza las pérdidas económicas a causa de *Neospora* están valoradas en 9.7 millones de euros anuales, lo cual ha generado cambio en la política interior haciendo de la

neosporosis una enfermedad de reporte obligatorio desde el 2001 (Hasler, et al., 2006), al ser una enfermedad distribuida a nivel mundial también se tiene registrado que en Australia y Nueva Zelanda las pérdidas económicas equivalen a 100 millones de dólares solamente en lo que respecta a los abortos (Barr, et al., 1998).

Se estima que las pérdidas económicas en la industria lechera en diez países de América, Europa y Oceanía ocasionadas por neosporosis son equivalentes a más de \$1298 millones de dólares anuales en donde el 64.9% de esta perdidas se concentran en el bovinos lecheros y el 35.1% en bovinos de carne, estimando perdidas economías a nivel mundial solamente a casusa de los abortos por \$2380 millones de dólares anuales (Reichel, et al., 2013). En México se reporta que las pérdidas anuales en granjas lecheras es de \$68.5 millones de dólares con un total de 2.7 millones de vacas lecheras en riesgo de infección y abortos causados por *Neospora* (Reichel, et al., 2013). En Aguascalientes, México el porcentaje de desecho anual en granjas lecheras es 22.2% siendo las principales causas de desecho los problemas reproductivos y productivos (Vitela-Mendoza, et al., 2004).

### **2.3.9 Patogenia**

Gran parte de las lesiones producidas por neosporosis se desarrollan principalmente en placenta y feto debido a la parasitemia que realiza mediante una transmisión endógena al activarse este protozooario en el momento en que la hembra entra en gestación y por diversos factores que favorecen la disminución de la respuesta inmune, reactivación y migración del parásito hacia los tejidos fetales ocasionando la presencia de abortos o el nacimiento de crías nazcan como portadores pasivos de la enfermedad, estas lesiones son originadas por la acción que realiza el parásito al penetrar cada una de las células nucleadas a las que tiene tropismo, reproducirse en su interior, causar la lisis de la célula y su subsecuente inflamación y necrosis (Dubey, et al., 2006; Rosbottom, et al., 2008; Rosbottom, et al., 2011).

En bovinos que adquieren la infección por primera vez mediante una transmisión horizontal todavía no se tiene identificada completamente la forma de cada una de las lesiones presentes y los acontecimientos que suceden durante el curso de esta infección, aunque se presume que gran parte de las lesiones generadas sean similares a las ocurridas en la toxoplasmosis ovina (Rosbottom, et al., 2007), en donde al igual que esta enfermedad se cree que al ingresar los ooquistes infectantes de *Neospora caninum* vía oral estos liberan en el intestino los

esporozoitos contenidos en su interior, los cuales al ser liberados deberían de invadir el epitelio intestinal y convertirse en taquizoitos lo cual se presume sucede al interior de los nódulos mesentéricos donde una vez generadas estas nuevas estructuras son liberadas vía circulatoria y distribuidas al resto del organismo (Dubey, et al., 2006).

Actualmente se tiene identificado que la transmisión endógena o transplacentaria es la vía más eficiente por la cual el parásito logra infectar al feto, factor que se ha sido demostrado en diferentes estudios donde vacas seropositivas a *Neospora caninum* son más propensas a manifestar abortos a comparación de vacas seronegativas, lo cual se relaciona a la posible reactivación del parásito debido a la disminución en la respuesta inmune que se genera de forma natural en vacas durante el segundo tercio de la gestación (Rosbottom, et al., 2011), existiendo evidencias de que el parásito se mantiene en forma latente en el organismo huésped en forma de quistes tisulares en sistema nervioso o músculo esquelético evadiendo así la acción del sistema inmune hasta su posterior reactivación; tanto en hembras no gestantes y durante los primeros meses de gestación el parásito es controlado por células inmunitarias como son linfocitos T citotóxicos (CD4<sup>+</sup>) sin embargo al ir avanzando la gestación se produce una reducción en la proliferación de estas células y del interferón gamma INF  $\gamma$  permitiendo la reactivación de la neosporosis y la liberación de bradizoitos que realizarán una migración hacia el útero de la madre para posteriormente vía transplacentaria invadir y colonizar los tejidos del feto donde el parásito se multiplicara, dañara la placenta y ocasionara una insuficiente oxigenación y nutrición que desencadenaran la expulsión del producto (Camarillo, et al., 2002; Dubey, et al., 2006; Rosbottom, et al., 2008).

El desarrollo fetal es de suma importancia para la patogenia de la neosporosis ya que durante los 280 días que dura la gestación de un bovino, conforme va avanzando la gestación también va madurando el sistema inmunológico de feto permitiendo que los animales cuyo desarrollo fetal sea más avanzado tengan mayores probabilidades de sobrevivir y de defenderse de la enfermedad a comparación de fetos jóvenes cuyo sistema inmunológico toda vía se encuentra inmaduro (Regidor-Cerrillo, et al., 2010), debido a que durante el primer tercio de gestación órganos como el timo, bazo y los nódulos linfáticos periféricos se encuentran en plena formación y son capaces de reconocer microorganismos patógenos ya para el segundo tercio de la gestación, siendo ya para el día 100 y 150 de gestación capaz de generar o iniciar una

respuesta inmune que posterior a los 150 días es capaz de reconocer y responder de forma adecuada contra diversos agentes etiológicos (Ortega-Mora, et al., 2007).

Al evaluar este mecanismo de maduración del sistema inmune en contra de *Neospora caninum* se ha logrado identificar por qué los fetos son sumamente sensibles a la neosporosis durante el primer tercio de la gestación y ocasionar así la muerte del producto, sin embargo para el segundo tercio de gestación el feto es capaz de crear una respuesta inmune en contra de este protozooario que puede permitirle llegar a sobrevivir a la parasitemia siendo capaz ya el último trimestre de generar una respuesta específica que le permita controlar la enfermedad y nacer aparentemente sano pero con la neosporosis latente en su organismo (Dubey, et al., 2006).

Inmunológicamente el equilibrio materno-fetal es sumamente importante ya que cualquier desequilibrio en esta estrecha relación ocasionaría que el feto sea reconocido como un cuerpo extraño y las defensas de la madre actúen sobre él para tratar de eliminarlo. Siendo de suma importancia todos aquellos cambios y lesiones producidos a nivel de placenta que pudieran terminar en aborto o reabsorción embrionaria, debido al daño ocasionado a los cotiledones y su repercusión en el aporte de nutrientes y oxígeno de la madre a la cría, así como una reducción en la producción de progesterona y el metabolismo de las prostaglandinas (Rosbottom, et al., 2008).

Este equilibrio se encuentra mediado por diferentes tipos de células del sistema inmune entre las cuales se encuentran citoquinas hematopoyéticas, macrófagos, citoquinas reguladoras del crecimiento e interleucinas, dicha respuesta mediada por células que se ve alterada por parásitos intracelulares como *Neospora caninum* los cuales inducen respuestas inmunológicas nocivas como la producción de citoquinas tipo Th, interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucinas (IL-2) y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) que propician la inflamación, que sumando la infección parasitaria son capaces de inducir por medio de las prostaglandinas una luteolisis prematura, contracciones uterinas y la expulsión del feto (Rosbottom, et al., 2011). Actualmente se desconoce de manera exacta que tan ligados están la respuesta inmunológica y la producción de prostaglandinas para que se genere la expulsión del producto más sin embargo se tiene la teoría que el insuficiente aporte de oxígeno durante la gestación estimula la síntesis de adenocorticotropina (ACTH) fetal, produciendo un incremento en el cortisol fetal e induciendo la secreción de estrógenos y prostaglandinas por

parte de la placenta lo cual origina una involución lútea y una disminución en la secreción de progesterona (Dubey, et al., 2006; Rosbottom, et al., 2011).

Microscópicamente las lesiones producidas en el feto se empiezan a generar una vez que el parásito ha colonizado la placenta y migrado vía sanguínea para invadir diferentes tejidos fetales como corazón, hígado, pulmón y músculo esquelético pero teniendo mayor tropismo hacia sistema nervioso central en cada uno de estos tejidos penetra al interior de las células para reproducirse y multiplicarse lo que da origen a un proceso inflamatorio no supurativo y la aparición de focos de necrosis en los cada uno de los diferentes tejidos debido a la lisis celular y liberación del parásito (Rosbottom, et al., 2007; Rosbottom, et al., 2008).

En fetos de mayor edad el proceso de multiplicación se ve ligeramente más restringido donde los focos de necrosis tisular se encuentran en forma localizada a diferencia de fetos jóvenes así mismo el grado de necrosis tisular puede estar generalizado y con una importante infiltración de monocitos y linfocitos en el proceso inflamatorio; macroscópicamente los fetos infectados con neosporosis pueden estar momificados, con un cierto grado de autólisis o sin ningún tipo de lesión aparente lo cual depende principalmente del desarrollo fetal, debido a este tipo de lesiones y de cada uno de sus diferentes mecanismos de acción la neosporosis es considerada a nivel mundial un agente primario de abortos en bovinos con un porcentaje del 5% de abortos en una explotación (Dubey, et al., 2006; Rosbottom, et al., 2011).

### **2.3.10 Epidemiología**

A nivel mundial se ha reportado la prevaencia de neosporosis en ganado lechero en un rango del 10-65% y asociado a problemas reproductivos y presencia de abortos en explotaciones lecheras (Dubey, et al., 2007). En Canadá la prevalencia en el ganado bovino productor de leche mediante pruebas ELISA dio como resultado que la infección por *N. caninum* se puede encontrar en la gran mayoría de los establos con prevalencias que van desde 5.6% hasta los 25.5%; mientras que en ganado de carne seroprevalencia fue de un 6.5 al 30 % (Paulo, et al., 2005).

Un estudio realizado en 35 estados americanos y 3 provincias canadienses encontró una seroprevalencia del 7% en perros infectados con *Neospora caninum* (Dubey, et al., 2007). En

estudios realizados en Japón, Corea y México, el porcentaje de infección en perros rurales (88-90%) fue mayor que lo reportado en perros de áreas urbanas (4-10%; Paulo, et al., 2005). Diversos autores han reportado la prevalencia de *Neospora caninum* en diferentes estados de la república Mexicana Coahuila (14-88%), Chihuahua (29-36%), Hidalgo (12-55%), Querétaro (43-100%), Jalisco (20-22%) y Veracruz (26-47%) atribuyendo como posible causa de prevalencias tan elevadas a la transmisión congénita y presencia de animales de edad mayor (5 años) las explotaciones pecuarias (Garcia-Vazquez, et al., 2005; Romero-Salas, et al., 2010).

En Aguascalientes la situación ante *Neospora* es similar a lo reportado en otros estados de la república, ya que se han reportado prevalencias desde el 32-100% en ganado lechero y en perros de áreas rurales y urbanas del 40 y 20% respectivamente (García-Vázquez, et al., 2002; Cruz-Vázquez, et al., 2008). En un estudio realizado en fetos abortados en vacas de establos lecheros de Aguascalientes se encontró que el 80% de los fetos resultaron positivos a *Neospora caninum* mediante PCR en establos con prevalencias del 59% a este protozoario (Medina-Esparza, et al., 2006). Entre los factores asociados a la seroprevalencia a *Neospora caninum* en ganado lechero de Aguascalientes se ha reportado que el agua de bebida de los animales es una potencial fuente de infección donde se identificó ADN del parásito en el 90% de las muestras colectadas, otros factores de riesgo que se asociaron fueron también la presencia de coyotes, antecedentes de presencia de micotoxinas y abortos en las explotaciones (Conzuelo, et al., 2011).

### **2.3.11 Diagnóstico**

El diagnóstico de neosporosis se puede llevar a cabo de diferentes maneras, tratando de correlacionar la manifestación de signos clínicos como el aborto, la historia clínica, las lesiones existentes en el feto complementándolas con diversas pruebas diagnósticas serológicas, histológicas y de biología molecular para generar un diagnóstico integral que nos ayude a saber con exactitud la presencia de este protozoario como causa de abortos en la explotación (Ortega-Mora, et al., 2007).

#### **2.3.11.1 Diagnóstico clínico**

Al manifestarse en una explotación lechera la presencia de abortos e inferir que son originados por *Neospora caninum*, se deben de asociar cada uno de los signos clínicos antes

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mencionados con cada uno de los diferentes cambios pos-mortem que presentan los fetos según el mes de gestación en el cual se hubieran generado, en caso de encontrar lesiones sugestivas con neosporosis se deberán tomar muestras correspondientes como placenta, hígado, pulmón, corazón, músculo esquelético y cerebro para histopatología y muestras de suero sanguíneo tanto de la madre como del feto para su análisis serológico y molecular (Dubey & Schares, 2006; Ortega-Mora, et al., 2007).

#### **2.3.11.2 Diagnóstico histopatológico**

Microscópicamente las lesiones causadas por *Neospora* puede encontrarse en una gran variedad de tejidos y órganos, en sistema nervioso central que pueden ir desde cerebro hasta médula espinal presentando principalmente focos de necrosis con una encefalomiелitis no supurativa e infiltrados de leucocitos y células mononucleares alrededor de las áreas de necrosis, lesiones similares son encontradas en miocardio e hígado en los cuales se aprecia cierto grado de necrosis de las células hepáticas y un ligero grado de autólisis en miocardio con infiltración de células mononucleares (Dubey, et al., 2006). A nivel de placenta las lesiones se concentran principalmente en los cotiledones y placentomas en los cuales se aprecia una inflamación no supurativa y la subsecuente necrosis causada por la penetración, multiplicación y liberación del parásito a nivel intracelular (Rosbottom, et al., 2008).

La inmunohistoquímica es una de las técnicas más confiables para demostrar en los tejidos que presenten lesiones la presencia de *N. caninum* (Yu, et al., 2009), para lo cual se emplea el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos contra este protozooario sometiendo un corte histológico desparafinado contra un anti suero específico y se evalúa la reacción generada contra el complejo avidina-biotina-peroxidasa, dicha reacción permite identificar de manera clara los parásitos teñidos en los tejidos, siendo más fácilmente identificable en cerebro y corazón (Dubey & Schares, 2006; Ortega-Mora, et al., 2007)

#### **2.3.11.3 Diagnóstico serológico.**

Las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* se basan en la utilización de antígenos de taquizoítos, esporozoitos o bradizoitos (Aguado-Martínez,

et al., 2005; Dubey & Schares, 2006; Yu, et al., 2009). Estas brindan información importante acerca del transcurso de la enfermedad ya que en infecciones primarias y en los días posteriores del primer contagio empiezan a generarse anticuerpos IgM e IgG, incrementándose hasta los 6 meses la producción de IgG; en donde de manera inicial a la infección las IgG<sub>1</sub> se irán incrementando mientras que en forma tardía las IgG<sub>2</sub> aumentará su concentración (Aguado-Martínez, et al., 2005). Los títulos de anticuerpos específicos en el bovino se mantienen a lo largo de su vida sin embargo varían conforme va transcurriendo la enfermedad, por lo cual bajos niveles de IgG<sub>1</sub> son indicativos de una respuesta a una infección reciente y al contrario altos niveles de IgG<sub>2</sub> son indicativos de una infección crónica y comúnmente observable en animales mayores a 6 meses expuestos naturalmente a la infección por *Neospora caninum* (Aguado-Martínez, et al., 2005; Dubey & Schares, 2006; Ortega-Mora, et al., 2007).

Entre los métodos serológicos utilizados se encuentran la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), estos métodos indirectos solo demuestran que los animales han estado expuestos al parásito mediante la detección de anticuerpos y debido a las características propias del ciclo biológico de este protozooario son indicativas de la presencia del mismo (Hye-Jin, et al., 2003; Dubey & Schares, 2006).

#### **2.3.11.4 Diagnóstico por biología molecular.**

La gran importancia de estas técnicas está principalmente sustentada por la facilidad para detectar en forma precisa ADN del parásito en pequeñas muestras de tejido ya sea de los fetos abortados o de cada uno de los diferentes hospederos tanto definitivos como intermediarios, se ha logrado identificar ADN en sangre líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico leche, semen y otros tejidos de animales infectados (Dubey & Schares, 2006; Ortega-Mora, et al., 2007).

Recientemente los diferentes protocolos para PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) no solo están enfocados a la identificación si no ya también a la cuantificación de ADN de *N. caninum*, la sensibilidad y especificidad del diagnóstico mediante PCR es influenciada por la selección de ADN adecuado, protocolos adecuados para colecta y almacenamiento de las muestras, extracción y purificación del ADN de la muestra (Dubey & Schares, 2006; Ortega-Mora, et al., 2007).

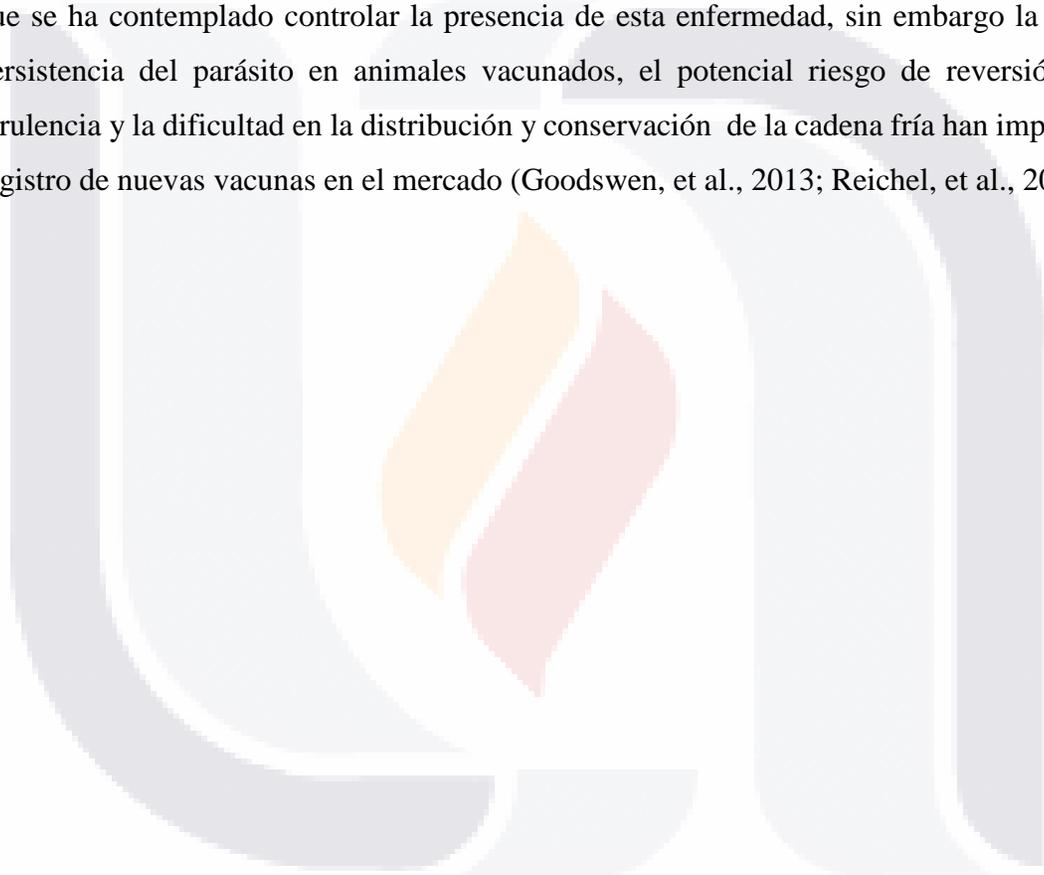
### **2.3.12 Tratamiento y control.**

En la actualidad no se cuenta con medidas adecuadas para dar un tratamiento eficaz y certero contra la neosporosis ya que los fármacos existentes no son capaces de generar una respuesta eficaz contra este protozoo, motivo por el cual las medidas para tratar esta enfermedad van más encaminadas hacia la prevención y el control para mantener en niveles bajos la prevalencia de la enfermedad dentro de una explotación pecuaria, teniendo en cuenta que para establecer un programa de control hay que tener bien establecida la relación costo-beneficio de las pruebas requeridas así como de los mecanismos para controlar esta enfermedad, debido a que estas medidas deben adaptarse a la región y a la explotación, debiendo tomar en cuenta factores como: la bioseguridad, prevalencia de la enfermedad en el hato, función zootécnica de los animales, repercusiones sobre la actividad reproductiva y productiva de los animales, identificar a animales positivos, selección de crías, restringir el acceso de perros a ciertas áreas de la explotación (bodega de granos y área de alimentación de los animales); lo ideal sería realizar pruebas serológicas a los animales existentes e introducidos en la explotación sin embargo la relación costo beneficio resulta incosteable para gran parte de los productores al igual que la eliminación de las vacas seropositivas a *Neospora caninum* la cual es una medida eficiente para controlar la enfermedad pero sumamente costosa de realizar en una explotación (Cruz-Vázquez, 2002; Dubey, et al., 2007). Diversos estudios han enfocado las medidas de control en dos principales vertientes para tratar de controlar la neosporosis en el ganado bovino lechero, dirigidos al control de la transmisión exógena y control de la transmisión endógena (Reichel, et al., 2014).

Evitar el contacto entre perros y rebaños, evitar que los perros y otros cánidos silvestres contaminen las tierras de pastoreo o los piensos, asegurar un bienestar adecuado de las vacas, especialmente durante el segundo trimestre de gestación, eliminar vacas seropositivas con registros de dos o más abortos, inseminar vacas seropositivas con semen de Limosín para evitar el nacimiento de animales infectados y reducir las tasas de abortos, verificar que la involución uterina sea normal después de un aborto (Almería & López-Gatius, 2013; Reichel, et al., 2014). El control de la transmisión endógena incluye medidas como realizar pruebas serológicas a los animales recién introducidos, transferencia de embriones, eliminar animales seropositivos, crianza selectiva, establecer medias de bioseguridad para minimizar el

contagio con otros agentes infecciosos (diarrea viral bovina, rinotraqueitis infecciosa bovina, salmonela y leptospira; estas medidas minimizaran los riesgos de reactivación y transferencia materno- fetal del parásito (Reichel, et al., 2014).

Otras medidas que se han sugerido para el control de la neosporosis incluye el uso de fármacos anti-coccidianos como el toltrazuril, clindamicina, azitromicina los cuales han demostrado tener la capacidad de retrasar la propagación de taquizoítos en el organismo e inhibir la síntesis de proteínas ribosomales del protozooario; La vacunación es otra alternativa que se ha contemplado controlar la presencia de esta enfermedad, sin embargo la elevada persistencia del parásito en animales vacunados, el potencial riesgo de reversión de la virulencia y la dificultad en la distribución y conservación de la cadena fría han impedido el registro de nuevas vacunas en el mercado (Goodswen, et al., 2013; Reichel, et al., 2014).



### 3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 HIPÓTESIS

El consumo de aflatoxinas en los alimentos por vacas Holstein, infectadas naturalmente con *Neospora caninum*, está relacionado con la reducción de la respuesta inmunológica y con la ocurrencia de aborto.

#### 3.2 OBJETIVOS

##### 3.2.1 Objetivo General

Identificar los factores inmunitarios y toxicológicos presentes en la exposición natural a la combinación de la infección por *Neospora caninum* y el consumo de aflatoxinas en el alimento de vacas Holstein y sus fetos abortados durante la primera y segunda gestación.

##### 3.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar y cuantificar la presencia de aflatoxinas existentes en el alimento de vacas Holstein durante la primera y segunda gestación.
- Identificar la respuesta inmune a la infección por *Neospora caninum* de ganado Holstein infectado naturalmente durante la primera y segunda gestación.
- Detectar los cambios bioquímicos y patológicos presentes durante la primera y segunda gestación de ganado Holstein, así como en los fetos abortados.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 LUGAR DE ESTUDIO

El presente trabajo se llevó a cabo en la región del altiplano central mexicano, en los estados de Aguascalientes y Jalisco, abarcando los municipios de El Llano (Aguascalientes), Lagos de Moreno y Encarnación de Díaz (Jalisco). El clima en esta región se clasifica como templado seco y semicálido semiseco, con lluvias principalmente en verano, con una temperatura promedio que oscila entre los 18.4 °C y una precipitación anual de 518.4 mm, (INEGI 2006).

### 4.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

#### 4.2.1 Selección de la Unidad Productora Lechera (UPL)

El presente estudio es de tipo descriptivo longitudinal para el cual fueron elegidas dos UPL por un método de conveniencia, en donde los establos seleccionados cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

- Ubicado en la región lechera de Aguascalientes-Jalisco
- Animales de mantuvieron sistema de estabulación libre.
- Brinde las facilidades necesarias para dar el seguimiento necesario a los animales seleccionados previamente a lo largo de dos gestaciones.
- Ambas explotaciones deben contar con animales reactivos a *Neospora caninum*.
- Uno de los establos deberá de mantener activo un programa de control de problemas de contaminación por micotoxinas en el alimento.
- Estar certificado como libres de brucelosis.
- Permitir la toma de muestras durante todo el tiempo que dure la investigación (mayo 2012 a mayo 2014).

En base a estos criterios selección se establecieron dos UPL en el cual UPL1 (Control), UPL2 (secuestrante).

#### 4.2.2 Selección de Animales

En cada uno de los establos se establecerá un grupo de 40 vaquillas a las que se mantendrá un monitoreo mensual a lo largo de 2 gestaciones, los grupos estarán divididos bajo las siguientes características:

##### Establo Control (UPL 1)

Grupo Control Nc<sup>-</sup>: 20 vaquillas seronegativas a *Neospora caninum* y expuestas naturalmente a micotoxinas.

Grupo Control Nc<sup>+</sup>: 20 vaquillas seropositivas a *Neospora caninum* y protegidas por un programa de control de micotoxinas.

##### Establo Secuestrante (UPL 2)

Grupo Secuestrante Nc<sup>-</sup>: 20 vaquillas seronegativas a *Neospora caninum* expuestas y protegidas por un programa de control de micotoxinas (presencia de secuestrante de micotoxinas en la dieta).

Grupo Secuestrante Nc<sup>+</sup>: 20 vaquillas seronegativas a *Neospora caninum* expuestas y protegidas por un programa de control de micotoxinas (presencia de secuestrante de micotoxinas en la dieta).

El inicio del estudio fue determinado al momento en que las vaquillas seleccionadas previamente cumplían 50 días posteriores a la inseminación artificial y su diagnóstico de gestación resulto positivo. A partir de ese momento se realizó un muestreo mensual durante su primera y segunda gestación.

### 4.3 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

#### 4.3.1. Ensilaje de maíz

Se realizó por medio de técnica de “W” o zig-zag que consiste en dibujar una línea imaginaria en el ensilaje sobre la cual se determina la elección de los puntos de muestreo y la distancia de los mismos (Bautista & Santos, 2004). Se tomarán cinco muestras de ensilaje de 1.0 kg

cada una, a una distancia de 2 m. aproximadamente una de otro y se depositarán en una bolsa de plástico, haciendo una muestra compuesta de 5 kg, a partir de la cual se obtendrá una muestra de 1.0 kg para el análisis y determinación de Aflatoxinas totales, el muestreo se llevara a cabo de forma mensual (Figura 3).



**Figura No. 3** Técnica de "W" (*Bautista & Santos, 2004*).

#### **4.3.2 Concentrado**

Se colectaron muestras de cada uno de los elementos que conforman parte de la dieta con un peso de 1.0 kg cada uno, se depositarán en una bolsa de plástico, haciendo una muestra compuesta a partir de la cual se obtendrá una muestra de 1.0 kg para el análisis y determinación de Aflatoxinas totales, el muestreo se llevara a cabo de forma mensual (Figura 4; Bautista & Santos, 2004).



**Figura No. 4 Almacén de alimentos**

#### **4.3.3 Ración total mezclada (RTM)**

Se realizará por medio de técnica de “W” (Figura 5) en los comederos de los animales sobre la cual se determinaran diferentes puntos para el muestreo y la distancia de los mismos donde se tomarán cinco muestras de alimento con un peso de 1.0 kg cada una, a una distancia de 2 m. aproximadamente una de otro y se depositarán en una bolsa de plástico, haciendo una muestra compuesta de 5 kg, a partir de la cual se obtendrá una muestra de 1.0 kg para el análisis y determinación de Aflatoxinas totales, el muestreo se llevara a cabo de forma mensual (Bautista & Santos, 2004).



Figura No. 5 Técnica de “W” para la ración total mezclada (Bautista & Santos, 2004).

#### 4.3.4 Obtención de muestras de los animales

In vivo se recogerá sangre entera de la vena coccígea en tubos con anticoagulante (citrato de sodio y EDTA) para la determinación de la actividad enzimática específica, proteínas totales, albumina y tiempo de protrombina, mientras que para la obtención de suero se tomarán muestras en tubos sin anticoagulante para valorar la respuesta inmune humoral materna. Al nacimiento de los terneros se volverá a tomar sangre de la madre y del ternero, previamente a la toma de calostro. Las muestras se colectadas mensualmente serán mantenidas en refrigeración ( $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hasta su uso posterior en el laboratorio (Figura 6).

Post-mortem en los abortos que se recogieron, se procedió a la necropsia, donde se evaluó la presencia de lesiones macroscópicas y el estado general del feto (fresco, momificado o autolizado), se colectaron muestras de encéfalo, corazón, pulmón, hígado y músculo esquelético para evaluar la producción de anticuerpos. De cada órgano se conservó una porción en formalina al 10%, tamponada a  $\text{pH}=7$  y estabilizada con metanol y mantenida a temperatura ambiente para su posterior análisis histopatológico; Otra porción de los mismos órganos mantuvo en conservación a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta proceder a la extracción de ADN y ARN, para el diagnóstico molecular mediante PCR anidada.

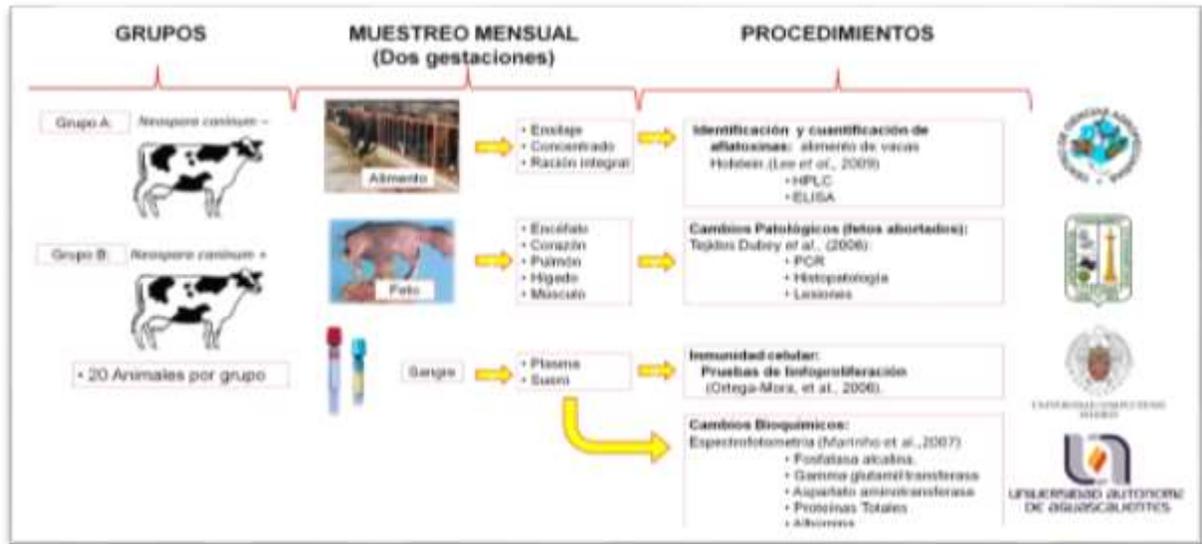


Figura No. 6 Diseño general del estudio.

## 4.4 TÉCNICAS DIAGNOSTICAS

### 4.4.1 Determinación Aflatoxinas mediante HPLC

El método de análisis se basa en la separación de componentes mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia, mediante la extracción de la muestra con cloroformo, La separación y determinación final se utilizando una columna de fase reversa (inversa) C<sub>18</sub>, seguida de una reacción de derivatización post-columna con solución acuosa de yod se procede a comparar el cromatograma del patrón de aflatoxina y de la muestra problema (AOAC, 1995) (Anexo 1).

### 4.4.2 Cuantificación de aflatoxinas totales mediante ELISA.

Las muestras de alimento se analizaron para la detección de aflatoxinas totales mediante ELISA con un kit comercial (RIDASCREEN®FAST marca Rbiopharm) La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están sensibilizados con anticuerpos dirigidos contra anticuerpos anti-aflatoxina. La aflatoxina libre y el conjugado aflatoxina-enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-aflatoxina (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados. La medición se hace fotométricamente a

450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina en la muestra (Reyes-Velázquez, et al., 2009) (anexo 2).

#### **4.4.3 Tiempo de protrombina**

El principio de la técnica se basa en que la adición de tromboplastina y calcio en muestras de plasma induce la formación del coágulo de fibrina. El método mide el tiempo que tarda en formarse el coágulo (Quick, 1935). Ver anexo 3.

#### **4.4.4 Proteínas totales**

El fundamento de la técnica se basa en que la proteína presente en la muestra reacciona con los iones cobre (II) en un medio alcalino, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría (Gornall, et al., 1949). Ver anexo 4

#### **4.4.5 Albúmina**

La metodología de la técnica se sustenta en que la albúmina presente en la muestra reacciona con el verde de bromocresol en un medio ácido, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría (Doumas, et al., 1971). Ver anexo 5.

#### **4.4.6 Fosfatasa alcalina**

El fundamento de la técnica se basa en que la fosfatasa alcalina cataliza en medio alcalino la transferencia del grupo fosfato del 4-nitrofenilfosfato al 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), liberando 4-nitrofenol. La concentración catalítica se determina a partir de la velocidad de formación del 4-nitrofenol, medido a 405 nm (IFCC, 1983; Rosalki, et al., 1993). Ver anexo 6.

#### **4.4.7 Gamma-glutamil transferasa**

La gamma-glutamiltransferasa ( $\gamma$ -GT) cataliza la transferencia del grupo g-glutamilo de la g-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida a la glicilglicina, liberando 3-carboxi-4-nitroanilina. La concentración catalítica se determina a partir de la velocidad de formación de la 3-carboxi-4-nitroanilina (IFCC, 2002; IFCC, 2010). Ver anexo 7.

#### **4.4.8 Alanina aminotransferasa**

El fundamento del método radica en que la alanina aminotransferasa (ALT o GPT) cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato, formando piruvato y glutamato. La concentración catalítica se determina, empleando la reacción acoplada del lactato deshidrogenasa (LDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm (Gella, et al., 1985) (García, et al., 2003). Ver anexo 8.

#### **4.4.9 Aspartato aminotransferasa**

La aspartato aminotransferasa (AST o GOT) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. La concentración catalítica se determina, empleando la reacción acoplada del malato deshidrogenasa (MDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm (Gella, et al., 1985). Ver anexo 9.

#### **4.4.10 Glutación Reducido**

El glutatión reducido es una antioxidante que tiene por función principal inhibir la peroxidación enzimática originada de la conjugación del glutatión reducido con xenobióticos y diversas moléculas que desencadenan un proceso de oxidación celular, para su cuantificación se utiliza o-ftalaldehído como un reactivo; el método tiene un porcentaje de recuperación del 90 al 110% (Hissin & Hilf, 1976). Ver anexo 10

#### **4.4.11 Transferasas de glutatión**

Las transferasas de glutatión son un grupo de enzimas que se encargan de iniciar el proceso de detoxificación, catalizando los compuestos del grupo -SH del glutatión y neutralizando los sitios electrofílicos para convertirlos posteriormente en compuestos más solubles (Habig, et al., 1974). Ver Anexo 11.

#### **4.4.12 Técnica para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*.**

Las muestras de suero sanguíneo se analizaron para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* mediante ELISA indirecto con un kit comercial (HerdCheck® IDEXX laboratorios); el fundamento consiste en emplear un antígenos (intracelulares y de

membrana) fijos en el kit para la detección de anticuerpos específicos en suero (Björkman & Uggl, 1999) (anexo 12).

#### **4.4.13 ELISA NcIgG, NcIgG<sub>1</sub> e NcIgG<sub>2</sub>.**

Se procedió a la valoración de la respuesta inmune humoral a lo largo del estudio mediante la determinación de NcIgG, NcIgG<sub>1</sub> e NcIgG<sub>2</sub>, usando un ELISA indirecto con proteínas solubles de *N. caninum* como antígeno con la finalidad de mostrar el comportamiento de la enfermedad mediante el monitoreo de IgG<sub>1</sub> y IgG<sub>2</sub>, los cuales son indicativos de la presencia de una infección crónica o reciente (Aguado-Martínez, et al., 2005) (anexo 13).

#### **4.4.14 ELISA NcSAG<sub>4</sub> y NcGRA<sub>7</sub>**

Los diferentes tipos de ELISA recombinantes usados para la detección de anticuerpos específicos contra *Neospora caninum* han demostrado tener una alta especificidad, utilizando proteínas de los gránulos densos NcGRA<sub>7</sub> y antígenos de superficie (Aguado-Martínez, et al., 2008; Alvarez-García, et al., 2013) (anexo 14).

#### **4.4.15. ELISA de avidéz**

El fundamento de esta técnica consiste en la evaluación de la maduración del sistema inmune posterior a una infección por *Neospora caninum*, lo cual genera un mayor incremento y reconocimiento por parte de anticuerpos específicos en donde los primeros anticuerpos producidos tras una primo infección tiene una menor afinidad por el antígeno que los anticuerpos producidos en una infección crónica, ver anexo 15 (Alvarez- García, 2003).

#### **4.4.16 Inmunofluorescencia indirecta en suero precalostral.**

El estudio de la respuesta humoral en suero precalostral de los terneros se realizó mediante la detección de IgG específicas frente al parásito utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Como antígeno se utilizó taquizoítos de *N. caninum* obtenidos en cultivo celular y fijados con formol tamponado a pH=7 (Alvarez-García, et al., 2013). El conjugado anti IgG de bovino unido a fluoresceína (Sigma, referencia F-7887) será utilizado a una dilución 1:150 en una solución PBS-azul de Evans (1:10000) ver Anexo 16.

#### **4.4.17. Pruebas diagnósticas en fetos abortados (histopatología y PCR).**

En caso de que ocurriese un aborto en los animales bajo estudio, se acudirá a la mayor rapidez posible para la recuperación del feto (>3 horas) para la toma de muestras de órganos (hígado pulmón, corazón, cerebro y musculo estriado) los cuales serán conservados en formalina neutra bufferada al 10% para su conservación. Las muestras fijadas y embebidas en parafina se teñirán con la técnica hematoxilina y eosina (Prophet, et al., 1994) para la identificación de lesiones ocasionadas por *Neospora caninum* y aflatoxinas (anexo 17). Las muestras conservadas de cerebro se les realizó la prueba de PCR anidado para identificar la presencia de ADN de *Neospora caninum* (Ellis, et al., 1999; Medina-Esparza, et al., 2006 ) (anexo 18).

#### **4.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN**

Los resultados de todas las variables obtenidas de los muestreos fueron capturadas y ordenadas en una base de datos electrónica estableciendo, el análisis estadístico de la primera y segunda gestación esta realizado mediante el procedimiento de modelos lineales generales de SAS (2009, version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC), con un arreglo factorial de tratamientos en donde el factor Secuestrante y el factor *Neospora* tendrán niveles dicotómicos que serán establecidos para el caso secuestrante como si o no y para *Neospora* + o -; quedando establecidos cuatro diferentes grupos en base al uso de secuestrante y la seropositividad a *Neospora caninum* de la siguiente manera Control *N. caninum* positivo, Control *N. caninum* negativo, Secuestrante *N. caninum* positivo y Secuestrante *N. caninum* negativo en donde serán analizadas las diferencias entre grupos para cada una de las variables respuesta (concentración de Aflatoxinas, tiempo de protombina, proteínas totales, albumina, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, gamma-glutamyl, glutatión reducido, transferasas de glutatión, NcIgG, NcIgG<sub>1</sub>, NcIgG<sub>2</sub>, NcSAG<sub>4</sub> y NcGRA<sub>7</sub>, INF  $\gamma$ ). La comparación de medias de cada uno de los grupos se realizó por medio de la prueba protegida de Fisher (LSD) y las medianas por la prueba de W de Mann-Whitney, considerando como significativo un nivel de confianza de para las pruebas anteriormente menciona  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 RESULTADOS CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS 1ª GESTACIÓN

Las muestras de alimento (ración total mezclada, ensilaje y concentrado) colectadas de las UPL 1 (Control) y UPL2 (secuestrante) entre los meses de mayo 2012 a enero 2013 durante la primera gestación y cuantificadas mediante ELISA se encontró que la UPL 1 obtuvo la concentración más alta de aflatoxinas en ensilaje y concentrado con concentraciones promedio de 14.4 y 8.8 µg/kg mientras que en la UPL 2 las fueron de 10.3 y 5.2 µg/kg respectivamente; sin embargo mediante el uso de un secuestrante de AFs como complemento de la dieta, la concentración de AFs presentes en la RTM de la UPL 2 fue de 5.3 µg/kg mientras que para la UPL1 el promedio general fue de 9.3 µg/kg encontrándose diferencias estadísticas significativas entre ambos grupos ( $P < 0.01$ ); en ambos grupos el ensilaje obtuvo las concentraciones más altas de AFs, presentándose un incremento en la UPL 2 a partir del cuarto mes de gestación donde se produce un incremento en la concentración de AFs hasta alcanzar su concentración máxima de 24 µg/kg (figura No. 9).

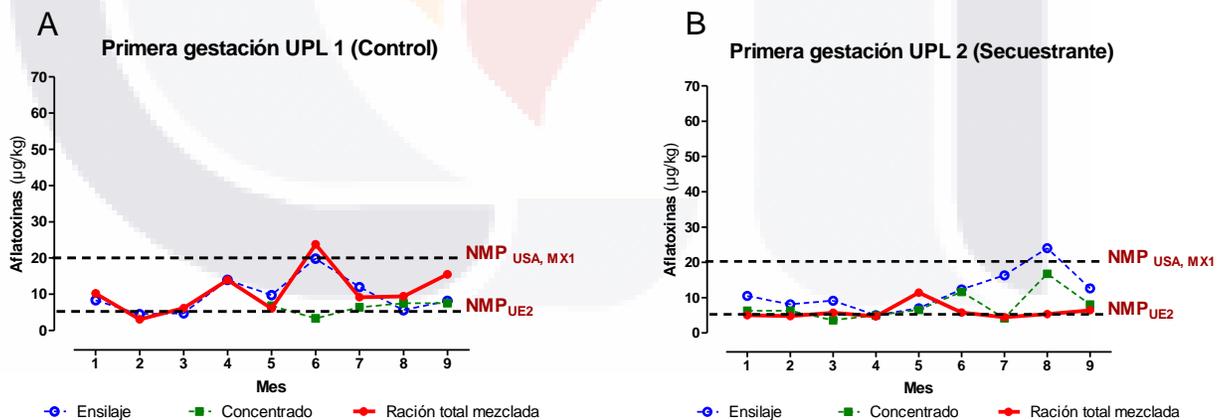
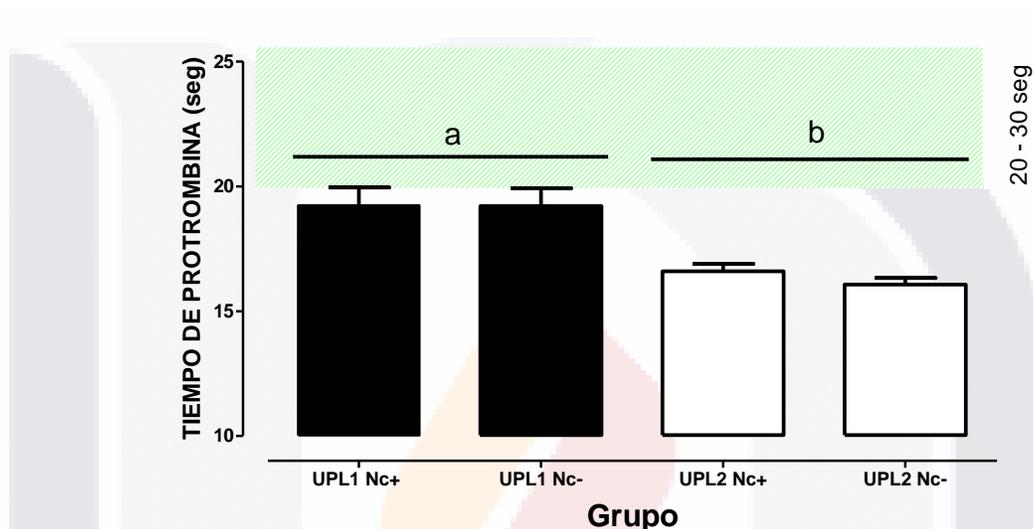


Figura No. 6 Concentración de Aflatoxinas totales en mediante ELISA (µg/kg) a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias de ingredientes (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ). UPL: unidad productora lechera; NPM: nivel máximo permitido; USA: United States of America; MX: México; UE: Unión Europea.

### 5.2 RESULTADOS PRUEBAS BIOQUÍMICAS 1ª GESTACIÓN

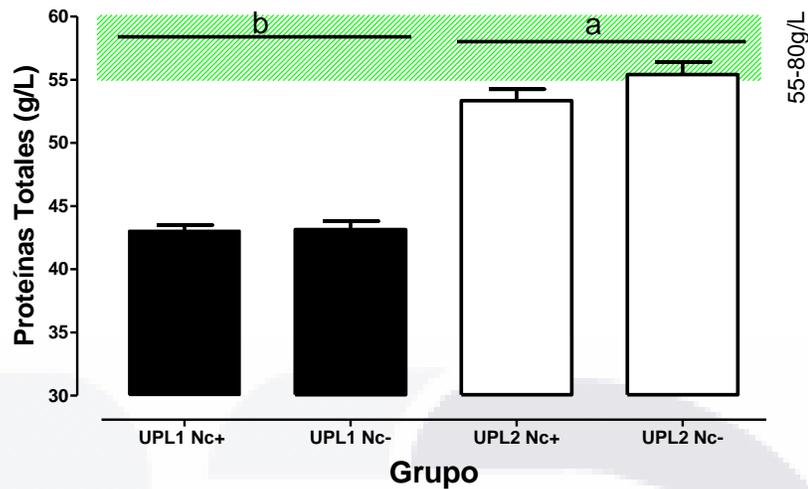
Respecto a las pruebas bioquímicas realizadas en plasma el tiempo de protrombina resulto con diferencias estadísticamente significativos ( $P < 0.01$ ) entre ambos grupos en donde el UPL 1 (Control) presento un incremento en este valor con un promedio entre los 18.7- 19.1 seg comparado con UPL 2 donde los valores se encontraron entre los 16 seg (figura No. 10).



**Figura No. 7 Tiempo de protrombina (seg) en vacas lecheras (primera gestación)**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Vr, Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

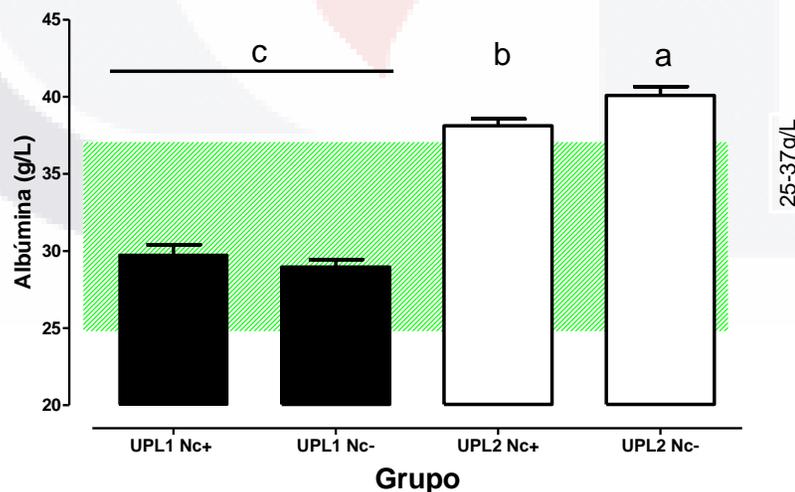
Los valores de proteínas totales se encontraron en la UPL 1 (43.0-43.1 g/L) por debajo de los rangos normales establecidos entre los 50 y 80 g/L, las diferencias entre grupos resultaron ser estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre La UPL 1 y UPL 2 (53.7-55.0 g/L) (figura No. 11).



**Figura No. 8 Proteínas totales (g/L) en vacas lecheras (primera gestación)**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Vr, Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

Los valores de albúmina sérica en UPL 1 se encontraron ligeramente disminuidos y cercanos al límite inferior del valor de referencia (25-37 g/L), con un valor promedio de 28.9 y 29.7 g/L, existiendo diferencias estadísticas altamente significativas (P>0.01) en comparación con los valores obtenidos para la UPL 2 donde las concentraciones de albúmina sérica se encontraron entre los 38.1 y 40 g/L (figura No.12).

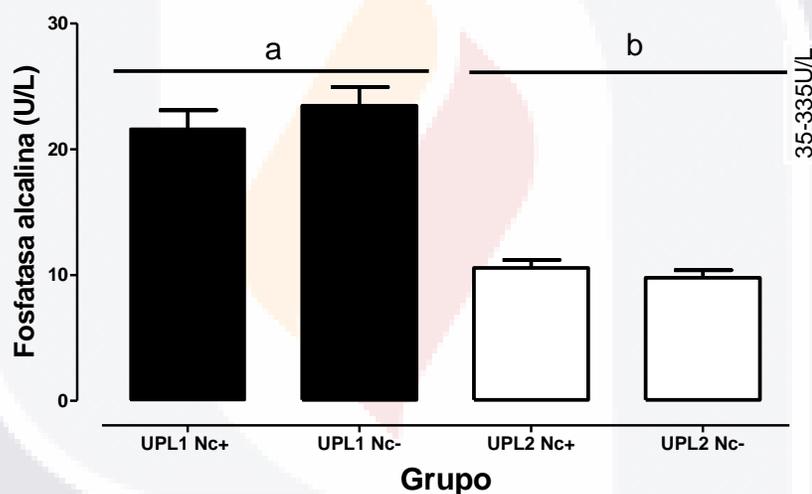


**Figura No. 9 Albúmina (g/L) en vacas lecheras (primera gestación)**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Vr, Valor de referencia. a-c Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

Así mismo se cuantifico la actividad enzimática de diferentes enzimas indicadoras de daño hepático y de importancia diagnóstica en procesos de intoxicación aguda o crónica or aflatoxicosis, estas enzimas forman parte de las herramientas diagnosticas del médico clínico para la valoración del funcionamiento hepático. En este estudio se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.5$ ) entre cada una de las UPL.

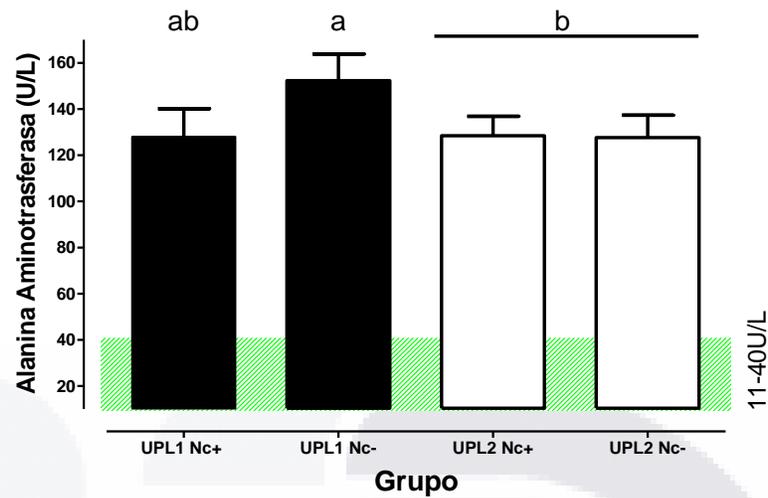
La actividad enzimática de fosfatasa alcalina (figura No. 13) mantuvo un promedio en ambos grupos por debajo del parámetro normal (35-355 U/L; kaneki, 1980; Cork et al., 2002) con valores entre las 21.6 y 23.4 U/L para la UPL 1 y de 10 y 11 U/L para la UPL 2. Existiendo diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0.05$ ).



**Figura No. 10 Fosfatasa alcalina (U/L) en vacas lecheras (primera gestación)**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Vr, Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

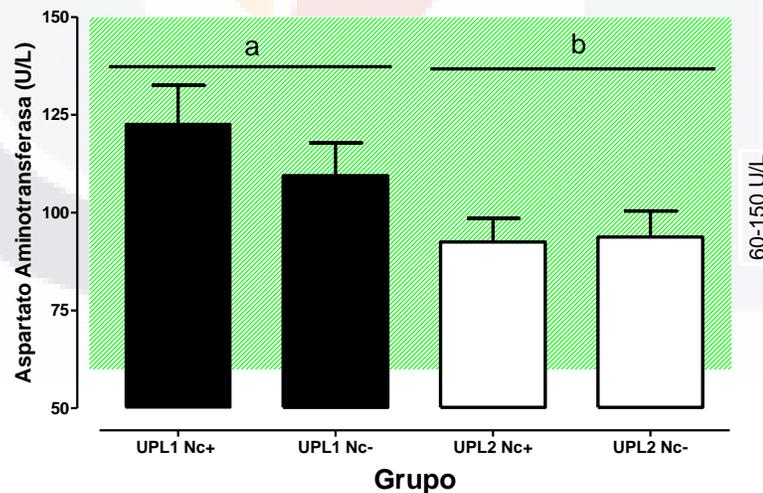
La enzima alanina aminotransferasa (figura No. 14) mostro significa estadística ( $P < 0.05$ ) entre ambos grupos, en donde la actividad enzimática para estuvo con valores promedio de 152.3 y 127.9 U/L para la UPL 1 y 126.8 y 127. 5 U/L para la UPL 2 siendo estos valores superiores al valor de referencia (11 - 40 U/L).



**Figura No. 11 Alanina Aminotrasferasa (U/L) en vacas lecheras (primera gestación)**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Vr, Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

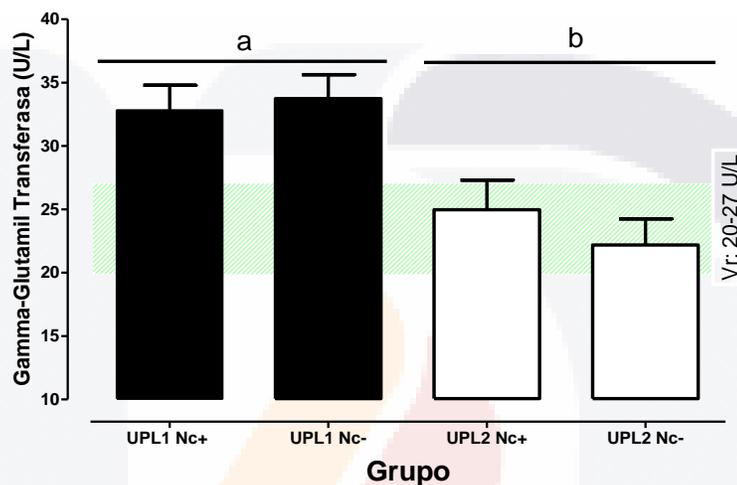
Los valores promedio de aspartato aminotransferasa para cada una de las UPL se mantuvieron dentro de los valores de referencia 60-150 U/L (Kaneko, 1980), sin embargo la UPL 1 tuvo registro valores entre los 109.4 y 122.6 U/L, mientras que para la UPL 2 los valores fueron de 90.7 - 92.6 U/L respectivamente (figura No. 15).



**Figura No. 12 Aspartato Aminotrasferasa (U/L) en vacas lecheras (primera gestación)**

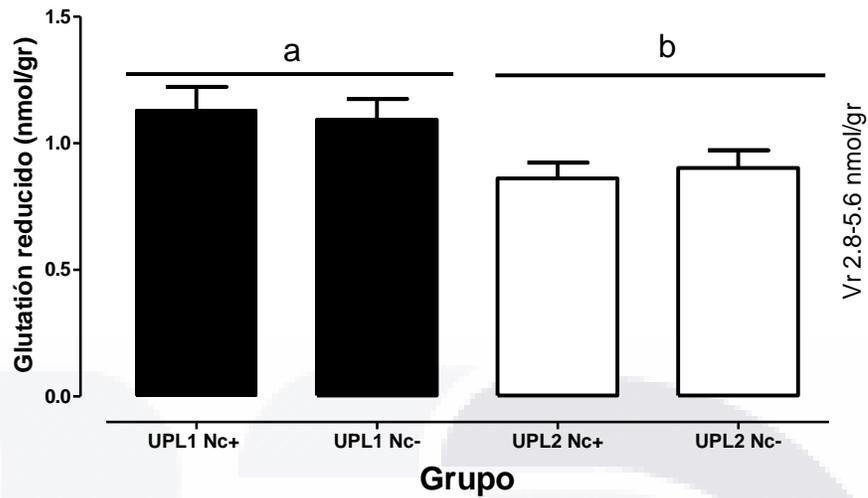
Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Vr, Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

Los valores promedio obtenidos para Gamma-glutamyl transferasa (figura No. 16), para los animales positivos y negativos a *Neospora caninum* de la UPL 1 fueron de 31.7 y 35.2 U/L respectivamente mientras que los valores para los animales de la UPL 2 en esos mismos grupos en la fueron 23.4 y 20.1 U/L respectivamente, los cuales se encontraron dentro de los límites del valor de referencia de 20 -27 U/L (Kaneko, 1980).



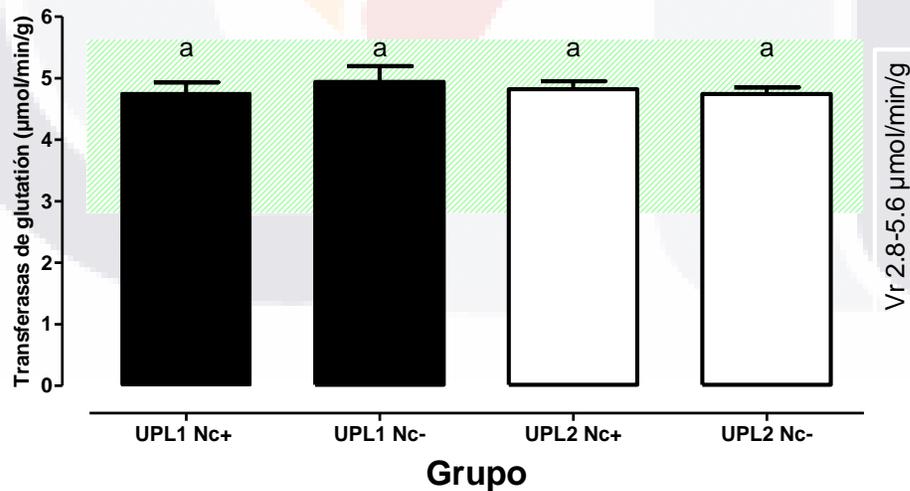
**Figura No. 13 Gamma-glutamyl transferasa (U/L) en vacas lecheras primera gestación**  
 Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Vr, Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

La figura No 17 muestra los valores obtenidos respecto a la concentración de glutatión reducido en los animales de los grupos UPL1 Nc+ y UPL1 Nc- 1.13-1.09 nmol/gr contra UPL2 Nc+ y UPL2 Nc- 0.86 y 0.90 nmol/gr respectivamente, encontrándose diferencias estadísticas entre ambas UPL ( $P > 0.05$ ).



**Figura No. 14 Glutathión (U/L) en vacas lecheras primera gestación**  
 Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45).

En la figura No 18 se muestra la actividad sérica de las transferasas de glutatión para todos los grupos de ambas UPL en los cuales no se encontraron diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) entre grupo teniendo valores entre los 4.65 y 4.9  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  para la UPL 1 y de 4.66 7 4.88  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  en la UPL 2.



**Figura No. 15 Transferasas de glutatión ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ ) en vacas lechera primera gestación**  
 Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45).

Con respecto a los parámetros reproductivos evaluados se encontró que en los animales del grupo control pertenecientes en a la UPL 1 presentaron algunos abortos durante su primera gestación siendo un total de 8 abortos; cuatro para cada uno de los grupos de la UPL 1 negativos y positivos a *Neospora caninum* mientras que en la UPL 2 no se presentó ningún aborto durante esta gestación, siendo significativas ( $P>0.05$ ) las diferencias en cuestión de la ocurrencia de abortos, mientras que para el numero de servicios a primer parto no se presentaron diferencias entre ninguna de las dos unidades productoras lecheras teniendo en ambas un promedio de dos servicios por concepción (tabla No. 1).

**Tabla 3 Parámetros reproductivos primera gestación**

Parámetro	UPL1 (Control)		UPL 2 (Secuestrante)	
	<i>N. caninum</i> negativo	<i>N. caninum</i> positivo	<i>N. caninum</i> negativo	<i>N. caninum</i> positivo
Servicios	2	2	2	3
Abortos	4	4	0	0

Vacas por grupo (n= 45).

### 5.3 RESULTADOS PRUEBAS INMUNOLÓGICAS 1ª GESTACIÓN

De los 90 animales que se seleccionaron durante la primera gestación solamente se procesaron muestras sanguíneas para pruebas inmunológicas de 53 animales, los cuales correspondieron a hembras cuya gestación logró llegar a término de manera exitosa (47 animales) y de hembras que abortaron durante su primera gestación (6 animales), las muestras de sangre de los animales restantes no se procesaron debido a que el término de su gestación fue posterior al cierre de la primer parte del estudio y a la realización de las pruebas inmunológicas.

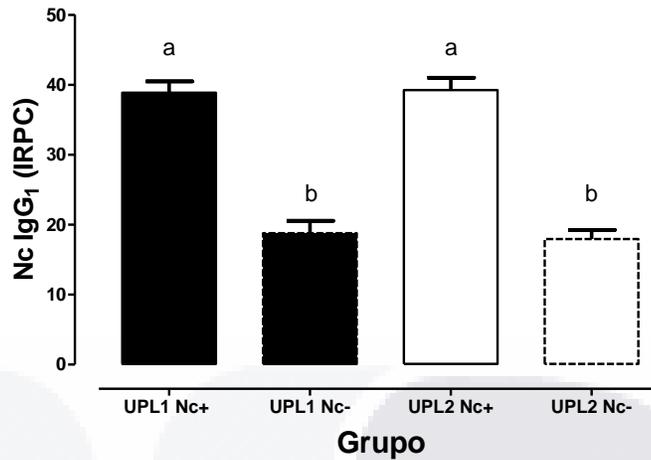
Los resultados serológicos de las muestras procesadas mostraron una mayor seroconversión de los animales establecidos al inicio del estudio como negativos a la infección por *N. caninum*; en donde en la UPL Nc- 2 el 21% de los animales seroconvirtieron; mientras que el grupo UPL1 Nc- el 54% de los animales inicialmente seronegativos resultaron al término de la primera gestación positivos a la presencia de este parásito. De manera general el porcentaje de animales que seroconvirtieron fue del 34% de animales negativos a *Neospora caninum*, mientras que en los animales positivos debido a la naturaleza y la cronicidad de la

infección ocasionada por este protozooario los grupos se mantuvieron sin cambio alguno a lo establecido inicialmente.

**Tabla 4 Seroconversión en vacas lecheras primera gestación**

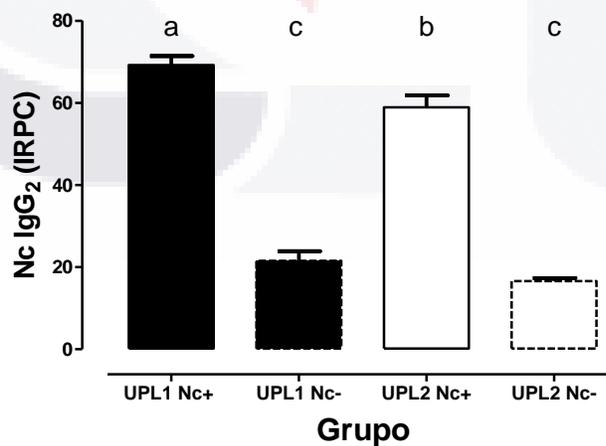
<b>GRUPO</b>	<b>No. animales</b>	<b>Animales Seroconvertidos (ELISA)</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
UPL 1 Nc-	13	7	54
UPL 1 Nc+	11	0	0
UPL 2 Nc-	19	4	21
UPL 2 Nc+	10	0	0

Los resultados inmunológicos de ELISA para la detección de Nc IgG<sub>1</sub> y la determinación del IRPC (índice relativo por ciento) demostraron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.01$ ) en relación a los niveles presentes en animales seropositivos con respecto a los animales negativos a *Neospora* en donde el grupo UPL 1 Nc+ y UPL 2 Nc+, obtuvieron un IRPC de 38.8% y 39.2% respectivamente a comparación con los grupos UPL 1 Nc- y UPL 2 Nc- con el 18.7% y 19.6% (figura No 19).



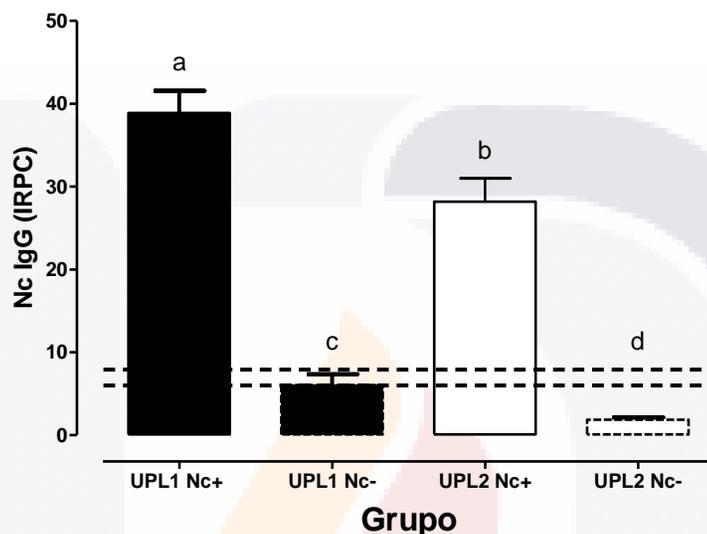
**Figura No. 16 Respuesta inmunológica a Nc IgG<sub>1</sub> primera gestación**  
 Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

Con respecto IRPC de Nc IgG<sub>2</sub> (figura No 20) los animales pertenecientes a los grupos seropositivos a *Neospora caninum* de la UPL 1 y 2 mostraron niveles entre el 69.2% y 58.9%, en comparacion con los animales negativos a *N. caninum* en donde el IRPC para la UPL1 fue de 29.1% y para la UPL2 del 14.7 existiendo diferencias estadísticas significativas entre cada uno de los cuatro grupos bajo estudio (P<0.01).



**Figura No. 17 Respuesta inmunológica a Nc IgG<sub>2</sub> primera gestación**  
 Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

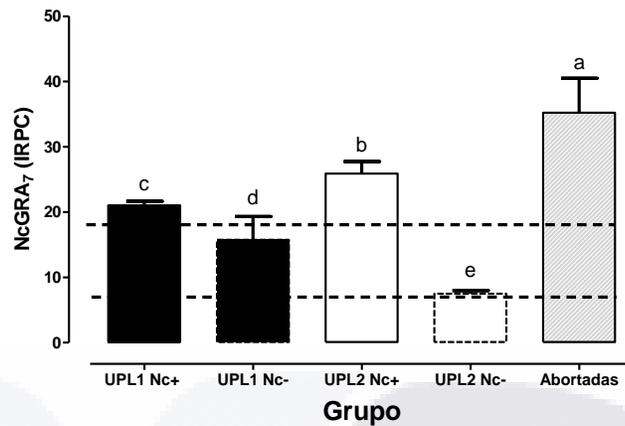
En inmunoglobulinas totales(figura No 21) mostraron valores promedio para el grupo UPL 1 Nc+ de un 38%, mientras que el grupo UPL 2 Nc+ fue del 28% siendo estadísticamente diferentes ( $P < 0.01$ ) mientras que para los grupos UPL 1 Nc- y UPL2 Nc- los valores fueron del 6.05% y 1.86% respectivamente ( $P < 0.01$ ).



**Figura No. 18 Respuesta inmunológica a Nc IgG primera gestación**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

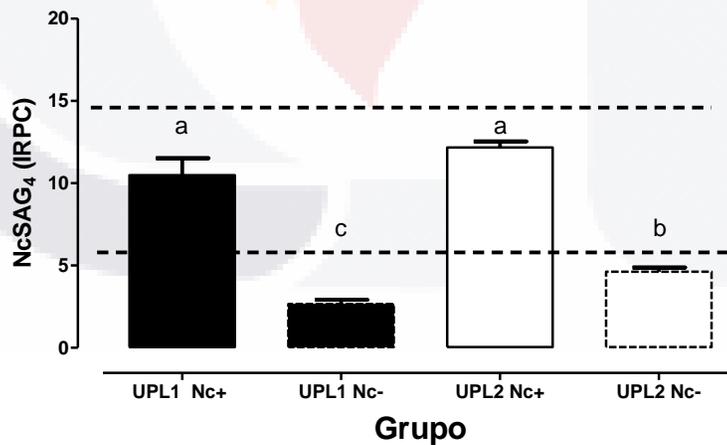
El análisis inmunológico mediante ELISA para la detección de proteínas específicas de *N. caninum* como NcGra<sub>7</sub> dio como resultado que los animales abortados obtuvieron los niveles más elevados de esta proteína ( $P < 0.01$ ) principalmente en los meses en los cuales ocurrió el aborto siendo el tercero y quinto de gestación los que se obtuvo un IRCP del 22 al 61% respectivamente y con una media de 35.23%. Para el grupo UPL1 Nc- el valor del IRPC fue del 15.7 %, mientras que los grupos UPL1 Nc+ y UPL2 Nc+ resultaron ser estadísticamente diferentes con medias de 21.0 y 25.9% respectivamente, el grupo UPL2 Nc- fue el grupo con los niveles más bajos de IRPC con un valor promedio del 7.49% (figura No 22)



**Figura No. 19 Respuesta inmunológica a NcGRA<sub>7</sub> primera gestación**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

Los resultados obtenidos de la evaluación de la respuesta inmune en relación a los antígenos de superficie como NcSAG<sub>4</sub> mostro diferencias significativas (P<0.01) donde los grupos seropositivos de la UPL1 y 2 tuvieron valores promedio de 10.4 y 12% respectivamente, mientras que los animales de los grupos seronegativos mostraron ser diferentes estadísticamente entre ellos, en donde el promedio por grupo para el caso fue de 2.6% para el grupo UPL1 Nc+ y de 4.6% para la UPL2 Nc- (figura No 23).



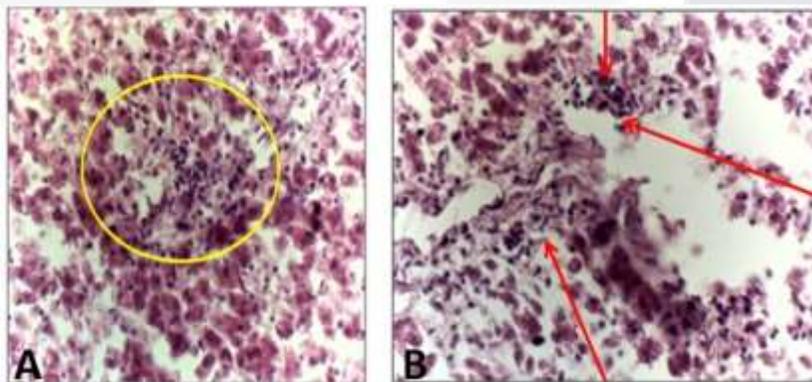
**Figura No. 20 Respuesta inmunológica a NcSAG<sub>4</sub> primera gestación**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

#### 5.4 RESULTADOS HISTOPATOLOGÍA Y PCR EN FETOS ABORTADOS PRIMERA GESTACIÓN

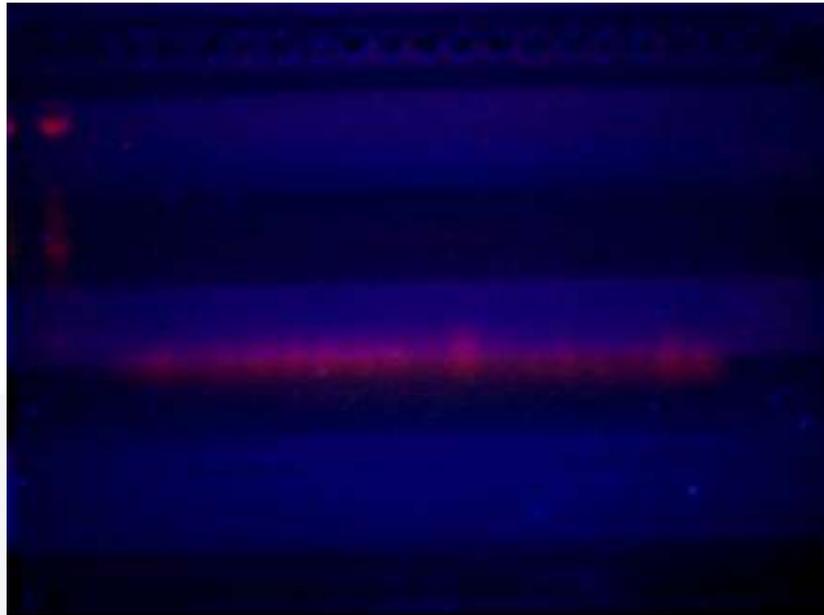
Durante la primera gestación se logró recuperar cinco de los seis fetos abortados, los cuales únicamente se presentaron en los animales de la UPL 1, presentándose tres abortos en hembras seropositivos a *N. caninum* y 3 en animales seronegativos a esta infección.

Las muestras de tejidos obtenidas de los fetos abortados (corazón, encéfalo, hígado, pulmón) se trabajaron por medio de histopatología para la identificación de lesiones asociadas a la infección por *N. caninum*, sin embargo solamente en uno de los fetos se logró identificar en los tejidos una infiltración linfocitaria perivascular asociada a neosporosis (figura No 24).



**Figura No. 21 (A) Hepatitis linfoplasmataria periportal multifocal, microscopio ocular a 10X, (B). Misma lesión vista en microscopio con ocular a 100X**

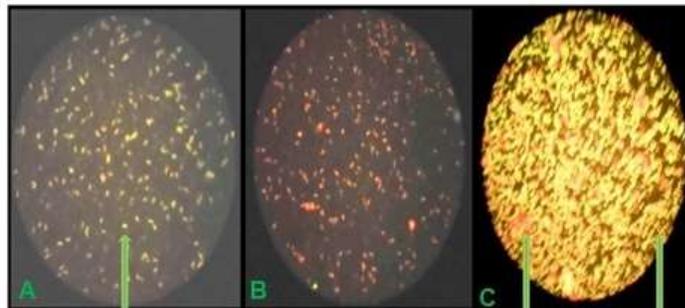
Los resultados obtenidos mediante la amplificación en PCR en tejidos embebidos en parafina dio como resultado la presencia de genoma de *Neospora caninum* en el 100% de los fetos y por lo tanto positivo la presencia de ADN de este protozoario (figura No 25).



**Figura No. 22** Gel de agarosa al 2.5% con marcador molecular, y amplificación en los 18 pozos, con 3 tejidos de 6 fetos abortados positivos

### **5.5 RESULTADOS INMUNOFLOURESENCIA INDIRECTA (IFI) EN CRÍAS DE LA 1ª GESTACIÓN**

De las 33 crías nacidas durante la primera gestación solamente se pudieron colectar 29 muestras de suero precalostral, las cuales fueron sometidas a Inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos específicos de *N. caninum* obteniendo como resultado el 87.9 % de las crías nacidas congénitamente infectadas, los porcentajes de becerros infectados congénitamente para cada uno de los grupos fue: UPL1 Nc+ 57.1% (4/7), UPL1 Nc- 60% (3/5), UPL2 Nc+ 70% (7/9), sin embargo para el grupo UPL2 NC- No se detectó la presencia del parásito en ninguna de las crías (figura No 26).

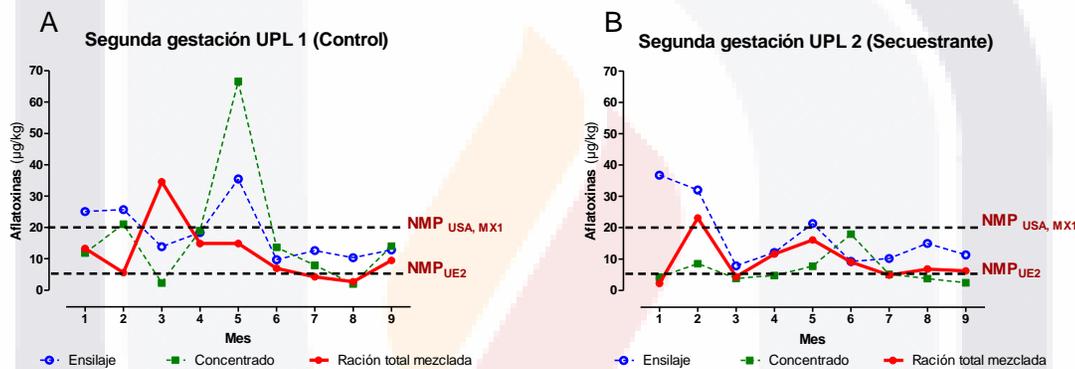


**Figura No. 23** Resultados IFI en becerros precalostrales (A) control positivo (40X) (B) control negativo (40X) (C) muestra positiva de suero precalostral (40X).

### 5.6. RESULTADOS CUANTIFICACIÓN DE AFLATOXINAS EN ALIMENTOS 2ª GESTACIÓN

Para la segunda gestación se realizó una reorganización de los animales de la UPL2 estableciéndose dos nuevos grupos en esta

Durante la segunda gestación la UPL 1 la concentración media de Afs en la RTM fue de 9.36 µg/kg, ensilaje y concentrado de 17. Y 6.47 µg/kg respectivamente en donde en el mes número 5 se alcanzaron la concentraciones más altas de estos dos ingredientes con una concentración de 35 y 66 µg/kg respectivamente existiendo diferencias estadísticas (P<0.01) entre la concentración presente entre el ensilaje y la ración integral de este grupo (Figura No 27).

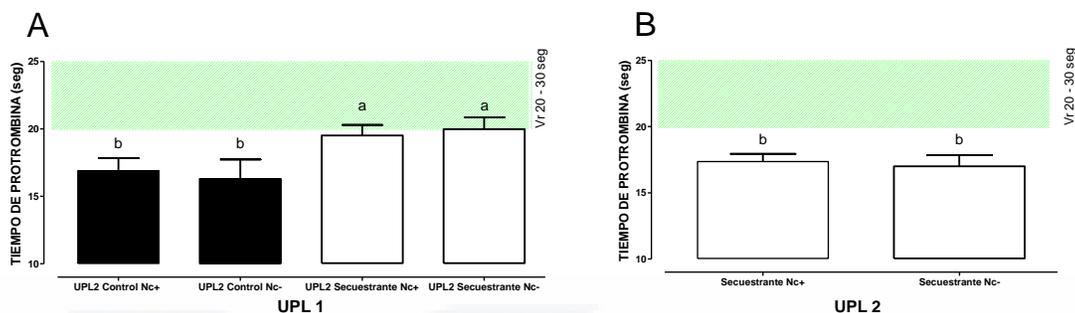


**Figura No. 24** Concentración de Aflatoxinas totales mediante ELISA (µg/kg) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2

En la UPL 2 el ensilaje fue la parte del alimento en la que se encontró los niveles más altos de aflatoxinas 18.2 µg/kg seguido por el concentrado con 17.5 µg/kg mientras que la RTM tuvo una concentración de AFs de 11.8 µg/kg en la cual el uso de secuestrante de AFs está presente la dieta de los animales (Figura No 27).

### 5.7. RESULTADOS PRUEBAS BIOQUÍMICAS 2ª GESTACIÓN

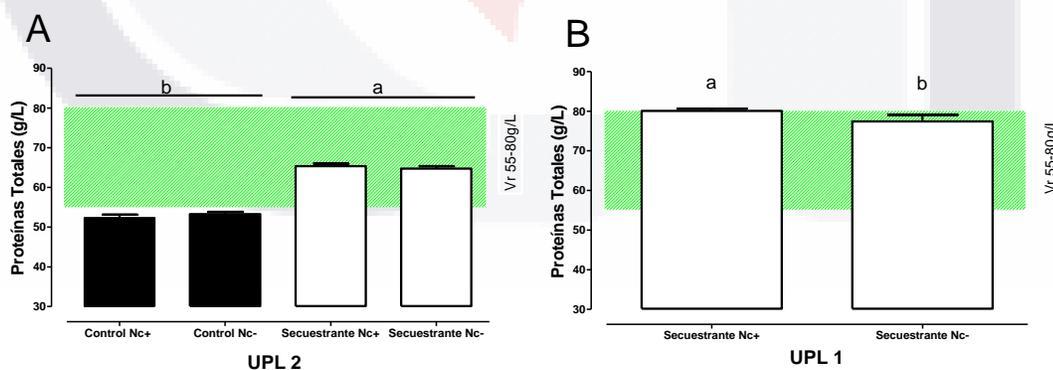
En base a los resultados obtenidos de los muestreos realizados durante la segunda gestación ocurrió en la UPL1 una disminución en los valores de tiempo de protrombina en los animales del grupo control promedio con valores entre los 16.3 y 16.9 segundos a comparación con los del grupo con secuestrante que se mantuvieron entre los 19 segundos, la UPL2 mantuvo un promedio de 17 segundos (figura No.28).



**Figura No. 25 Tiempo de protrombina (seg) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

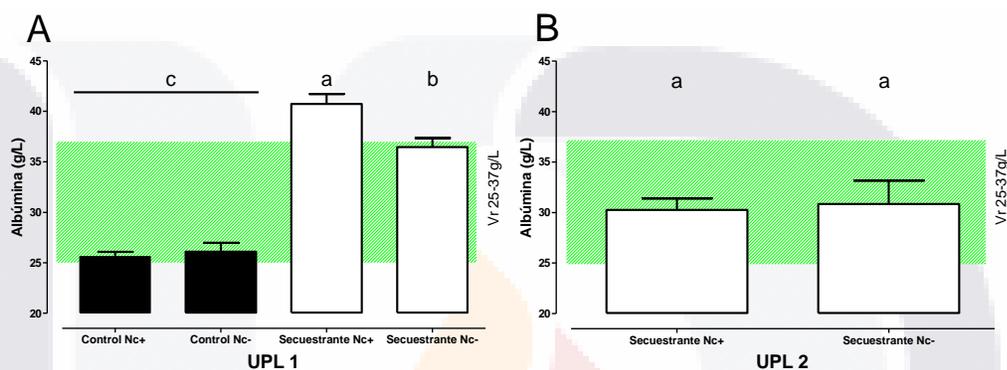
La segunda gestación mostró diferencias estadísticas significativas en la UPL 1 con respecto a las proteínas totales (P<0.5) en animales de los grupos control donde los valores se mantuvieron entre los 64 y 65 g/L con respecto a los animales de los grupos con secuestrante que oscilaron entre los 79.8 y 77.4 g/L. Para la UPL 2 la concentración media de proteínas totales de los animales que estuvieron sometidos a la administración dietética de un secuestrante (grupos Secuestrante Nc+ y Secuestrante Nc-) fue de 65.2 y 64.7 g/L respectivamente (figura No. 29).



**Figura No. 26 Proteínas totales (g/L) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

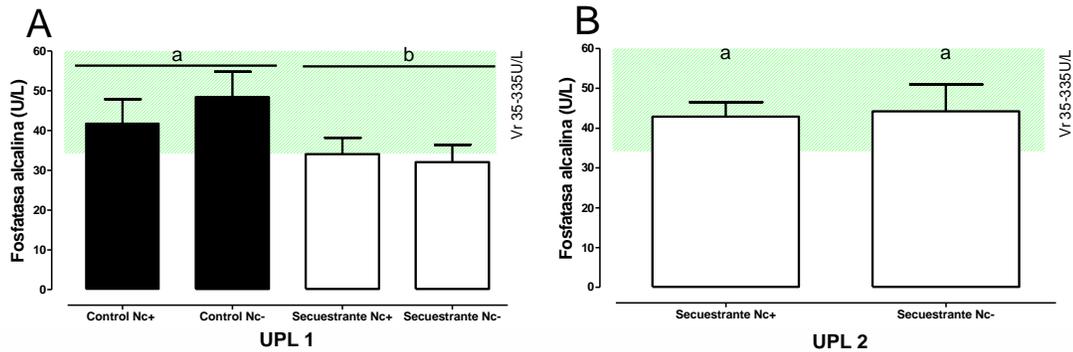
Los valores encontrados con respecto a albúmina sérica mostraron diferencias entre los grupos control y Secuestrante de la UPL 1 en donde el grupo control mostro niveles entre los 25 y 26 g/L los cuales fueron más bajos comparados con los grupos con secuestrante que se encontraron entre los 42 y 36 g/L; mientras que los animales de ambos grupos de la UPL 2 se mantuvieron con valores promedio de 30 g/L (figura No. 30).



**Figura No. 27 Albúmina (g/L) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

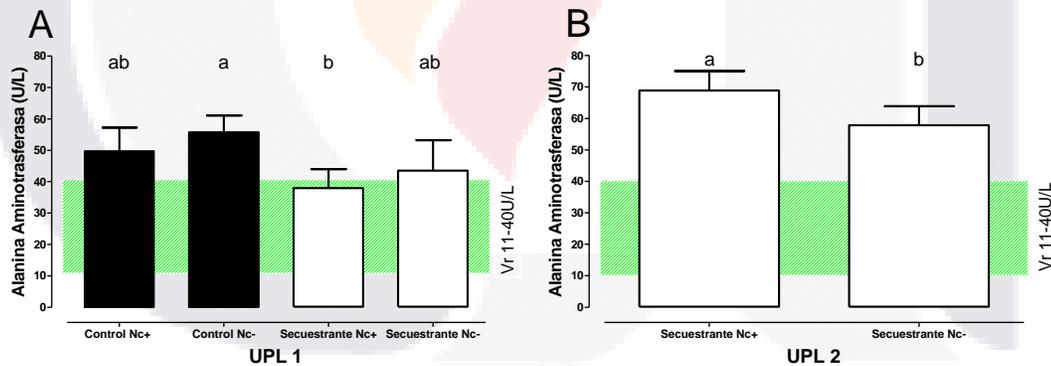
La fosfatasa alcalina se encontró más elevada en los animales del grupo Control de la UPL 1 en donde los animales Control Nc- tuvieron un promedio de 48.5 U/L y el Control Nc+ de 42 U/L siendo estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) estos valores con respecto a los obtenidos a los grupos con secuestrante donde el promedio se encontró entre los 36 y 33 U/L para los grupos Secuestrante Nc+ y Nc-, mas sin embargo los valores de estos mismos grupos pero de la UPL 2 se encontraron entre los 42 y 44 U/L respectivamente (figura No. 31).



**Figura No. 28 Fosfatasa alcalina (U/L) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

Para la variable alanina aminotransferasa los resultados obtenidos fueron para la UPL 2 de los grupos control positivos y negativos a *Neospora* de 49 y 55 U/L mientras que para los grupos con Secuestrante fue de entre 37 y 43 U/L mas sin embargo para las UPL 1 el promedio para los grupos con secuestrante se mantuvo entre los 55 y 66 U/L (figura No.32).

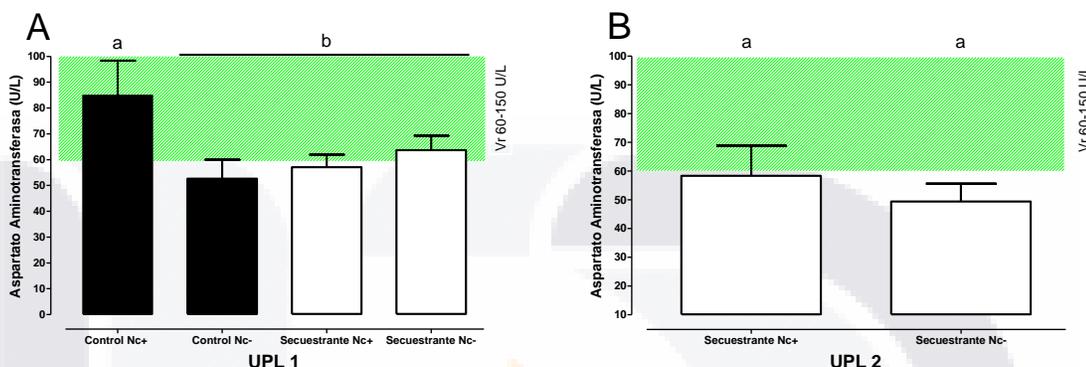


**Figura No. 29 Alanina aminotransferasa (U/L) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

Los valores enzimáticos de aspartato aminotransferasa en los animales pertenecientes al grupo Control Nc+ de la UPL1 fueron los más altos con niveles de 85 U/L los cuales fueron significativamente diferentes a los de los demás grupos ( $P < 0.05$ ) siendo para el grupo Control

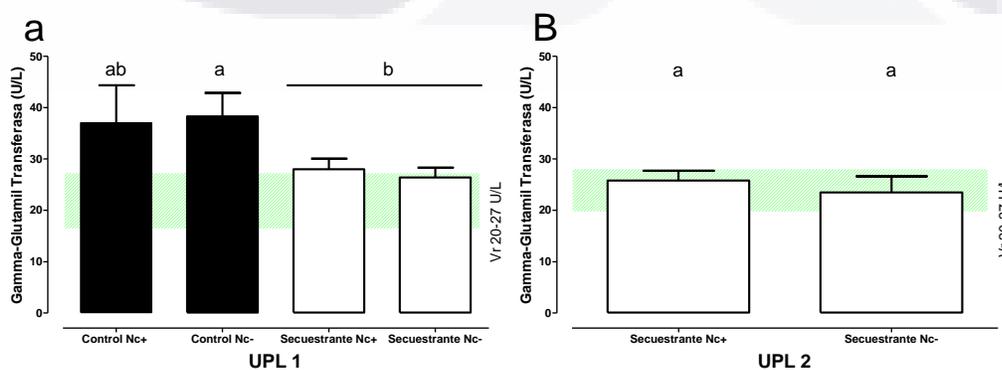
Nc- de 52.8 U/L mientras que los valores de los grupos Secuestrante Nc+ y Secuestrante Nc- mantuvieron entre 57 y 63 U/L; para la UPL2 fue de 57 y 46 U/L de la par los grupos Secuestrante Nc+ y Secuestrante Nc- respectivamente (figura No.33).



**Figura No. 30 Aspartato aminotransferasa (U/L) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

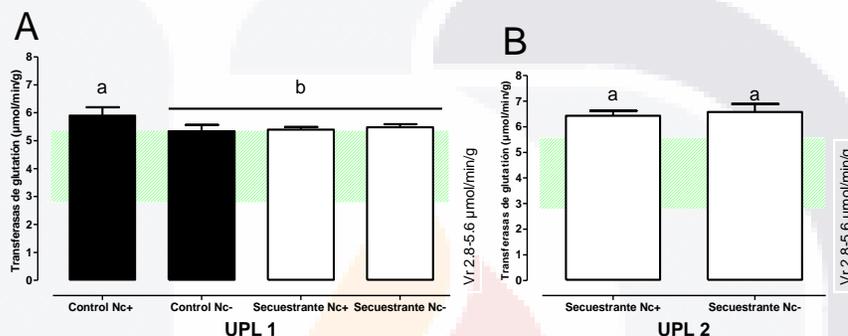
Gamma-glutamil transferasa fue otra de las variables que se presentó elevada en los grupos control de la UPL1 donde el promedio se estableció entre los 38 y 37 U/L superando los niveles de los grupos con secuestrante de esa misma explotación donde los valores reportados fueron 28 y 26 U/L y encontrándose diferencias significativas entre grupos ( $P < 0.05$ ) así mismo comparando estos mismos grupos con los grupos con secuestrante de la UPL 2 se mostraron con valores similares entre los 26 y 23 U/L (figura No.34).



**Figura No. 31 Gamma-glutamil transferasa (U/L) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

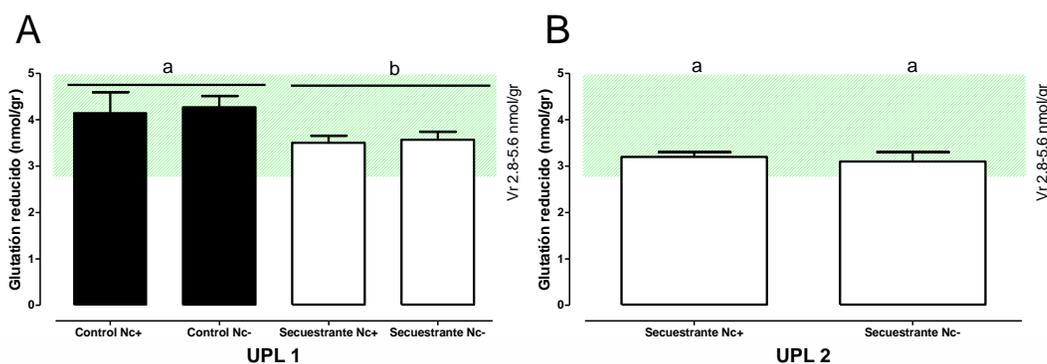
Las Transferasas de glutatión solo mostraron que para la UPL1 solamente el grupo Control Nc+ resulto ser estadísticamente significativo con respecto a los otros grupos teniendo un promedio de 5.9 (µmol/min/g) mientras que para que para el otro grupo Control y Secuestrante el promedio se mantuvo entre los 5.6 (µmol/min/g) (figura No. 35)



**Figura No. 32 Transferasas de glutatión (µmol/min/g) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

La figura No. 36 muestra los valores generales obtenidos para glutatión reducido en donde se observa que en la UPL1 los grupos Control Nc+ y Nc- presentaron diferencias (P<0.05) con respecto a los grupos con secuestrante de esa misma en donde los valores cuantificados fueron para los grupos control de 4.11 y 4.28 nmol/gr y para los de secuestrante de 3.56 y 3.58 nmol/gr valores similares a los encontrados en la UPL2 en donde el grupo Secuestrante Nc+ tuvo una media de 3.20 nmol/gr y mientras que el Secuestrante Nc- fue de 3.10 nmol/gr.



**Figura No. 33 Glutación reducido (nmol/gr) segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

### 5.6. RESULTADOS PRUEBAS INMUNOLÓGICAS 2ª GESTACIÓN

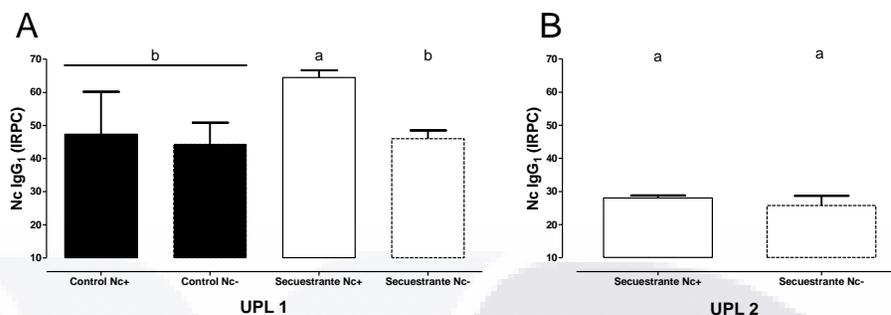
Durante la segunda etapa de esta investigación correspondiente a la segunda gestación, se le dio el seguimiento a un total de 44 animales en donde se tuvo una seroconversión general del 80% mientras que por unidad productiva lechera fue UPL1 75% (3/4) y UPL2 70% (7/10) en los animales seronegativos generándose un incremento el número de los animales positivos a causa de la neosporosis.

**Tabla 3 Seroconversión en vacas lecheras segunda gestación**

Grupo	No. animales	Animales Seroconvertidos (ELISA)	Porcentaje (%)
UPL 1 Nc-	4	3	75%
UPL 2 Nc-	10	7	70%

Los resultados inmunológicos con respecto a Nc IgG<sub>1</sub> demostraron diferencias estadísticas significativas (P<0.01) en la UPL1 en los animales pertenecientes a los grupos seropositivos con respecto a los animales negativos a *Neospora*, donde el grupo Control Nc+ y Secuestrante Nc+ obtuvieron un IRPC de 47.3 y 64.4% respectivamente en comparación con los grupos Control Nc- y Secuestrante Nc- donde el promedio fue de 44.4 y 45.9%; en la UPL2 los no

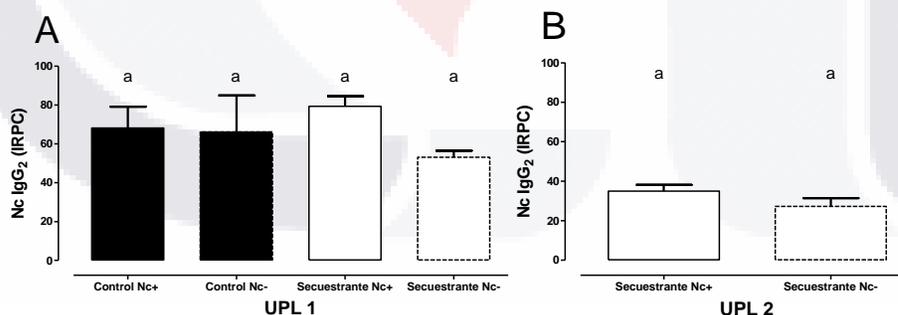
existieron diferencias entre los grupos Secuestrante Nc+ y Secuestrante Nc- en donde el IRPC se mantuvo en 28.0 y 25.7% respectivamente (figura No.37).



**Figura No. 34 Respuesta inmunológica a Nc IgG<sub>1</sub> segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

Con respecto al IRPC de Nc IgG<sub>2</sub> los animales pertenecientes a los grupos seropositivos (control y secuestrante) a *Neospora caninum* de la UPL1 mostraron niveles del 68.1 y 79.3%, el grupo Control Nc- 66.2% y Secuestrante Nc- de 53.1% no existiendo diferencias estadísticas entre los valores de cada grupo (P>0.05).en la UPL2 el IRCP fue de 34.9 y 27.2 % para los grupos secuestrante positivo y negativo a *N. caninum* (figura No.38).

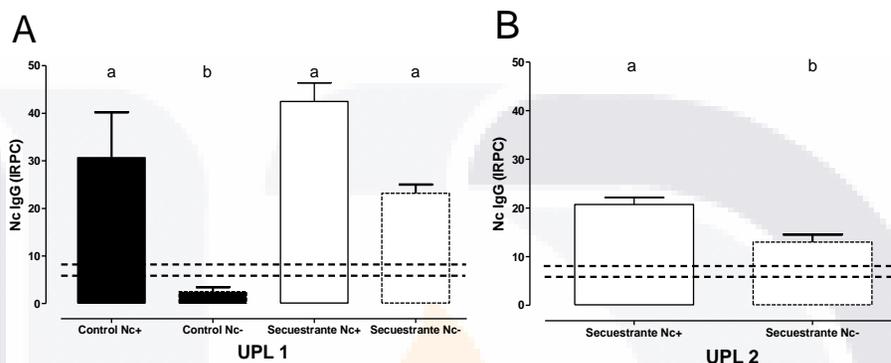


**Figura No. 35 Respuesta inmunológica a Nc IgG<sub>2</sub> segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

Las inmunoglobulinas totales (IgG) en los animales de la UPL1 mostraron valores para el grupo Control Nc+ y Control Negativo de 30.6 y 2.5% respectivamente, mientras que para el grupo Secuestrante Nc+ de 42.45 y 23.1 para el grupo Secuestrante Nc-, siendo solo

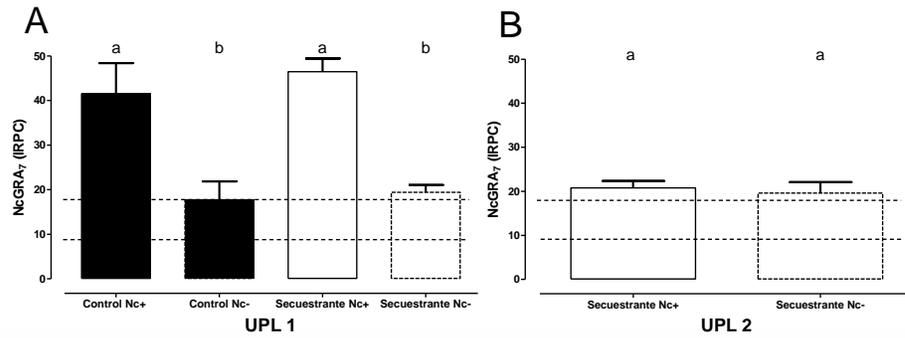
estadísticamente diferente ( $P < 0.01$ ) el grupo Control Nc- con respecto a todos los demás grupos establecidos. En la UPL2 el IRPC fue de 20.6 y 13.0% para los grupos Secuestrante N. caninum positivo y negativo existiendo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre ambos grupos (figura No.39).



**Figura No. 36 Respuesta inmunológica a Nc IgG segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

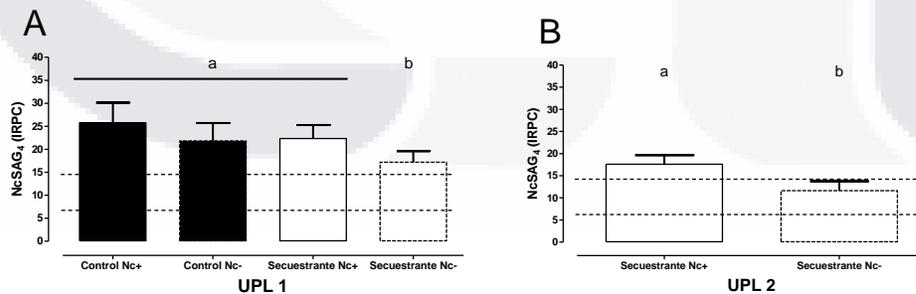
El análisis inmunológico de proteínas específicas de *N. caninum* como NcGra<sub>7</sub> dio como resultados que los animales de la UPL1 seropositivos obtuvieron los niveles más elevados de esta proteína (Control Nc+ 41.5%, Secuestrante Nc+ 46.4%) y estadísticamente significativos ( $P < 0.01$ ) en comparación a los animales seronegativos (Control Nc- 17.6%, Secuestrante Nc- 19.4%). En los grupos Secuestrante Nc+ y Secuestrante Nc- correspondientes a la UPL2 el IRPC fue del 20.7 y 19.6% respectivamente y siendo estadísticamente semejantes ambos grupos ( $P > 0.05$ ; figura No.40).



**Figura No. 37 Respuesta inmunológica a Nc GRA<sub>7</sub> segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

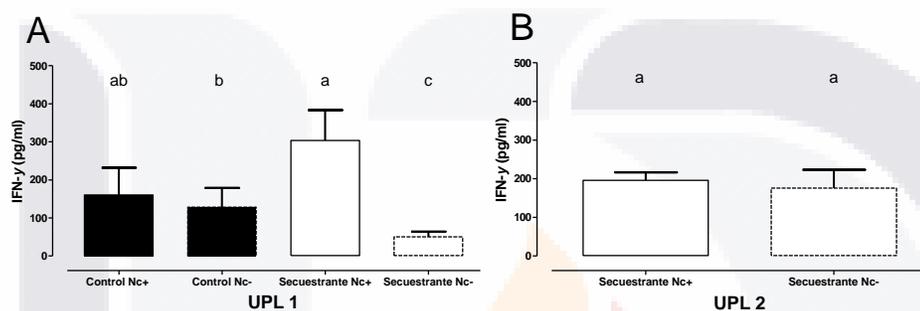
Los resultados de la evaluación de la respuesta inmune respecto a la presencia de antígenos de superficie como NcSAG<sub>4</sub> mostro diferencias significativas (P<0.01) entre varios de los grupos de estudio en donde los grupos seropositivos se comportaron diferentes a los seronegativos siendo los grupos Control Nc+, Control Nc- y Secuestrante Nc+ de la UPL1 estadísticamente semejantes con valores promedio de IRPC de 25.7, 21.8 y 22.3 respectivamente; para la UPL2 los grupos Secuestrante Nc+ y Secuestrante Nc- mostraron ser diferentes estadísticamente entre ellos, en donde el promedio por grupo para el caso de fue de 17.5 y 11.6 % respectivamente (figura No.41).



**Figura No. 38 Respuesta inmunológica a Nc SAG<sub>4</sub> segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**

Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey, p<0.01).

Durante la segunda gestación los niveles séricos de INF- $\gamma$  de la UPL1 se encontraron más elevados en el grupo Secuestrante Nc- con un concentración cercana a los 303 pg/ml, en los Grupos control Nc+ y Control Nc- los valores fueron de 160 y 128 pg/ml, siendo el grupo Secuestrante Nc- el que obtuvo las concentraciones más bajas con 50.2 pg/ml, El comportamiento de los grupos de la UPL2 fue similar entre ellos donde la concentración de INF- $\gamma$  fue de 195 y 175 pg/ml para los grupos Secuestrante Nc+ y Secuestrante Nc- (figura No.42).



**Figura No. 39 Respuesta inmunológica a INF- $\gamma$  segunda gestación (A) UPL 1 (B) UPL 2**  
 Cada valor representa el promedio de la cuantificación obtenida de procesar cada muestra por duplicado de las vacas del grupo (n= 45). Valor de referencia. a-b Literales diferentes muestran diferencias significativas entre las medias del grupo (Prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ).

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1 NIVELES DE CONTAMINACIÓN POR AFLATOXINAS EN ALIMENTO

Los niveles de aflatoxinas presentes en las muestras de alimento (TMR) analizadas mostraron que los valores detectados de AF totales se encontraron dentro del rango permitido por la Norma Oficial Mexicana que establece una concentración máxima de 20 µg/kg en alimentos destinados para el consumo de los animales (EUM-SS, 2002) sin embargo estas mismas concentraciones se encuentran por encima del límite establecido por la Comunidad Europea de 5 µg/kg (European, 2002).

Los resultados obtenidos de la cuantificación de AF en ensilaje de maíz son similares a los obtenidos por otros autores donde identifico en el 100% de sus muestras de ensilaje la presencia de *Aspergillus spp.* y una concentración de aflatoxinas en un rango entre los 12 a 15.7 µg/kg, mostrando la importancia de la presencia de estos hongos productores de micotoxinas y la producción de AFs como un metabolito secundario de estos hongos (Reyes-Velazquez, et al., 2008). Así mismo en muestras de alimento analizadas (ración total mezclada) de vacas lecheras se encontró que el 92.5% de las muestras se encontraban contaminadas con concentraciones que fueron desde los 4.88 a 24.89 µg/kg de AF (Reyes-Velázquez, et al., 2009) rango similar en el cual se encontraron los valores de las muestras de RTM de nuestro estudio en ambas UPL, con resultados similares a los valores obtenidos en otros estudios donde se encontró una concentración por aflatoxinas mediante HPLC en el 99% de sus muestras con una concentración promedio de 7.6 µg/kg (Rodriguez, et al., 2011), otros reportes han encontrado concentraciones superiores (Bansal, et al., 2011) examinando un total de 2000 muestras durante un periodo de dos años (2008-2009) donde los niveles promedio de aflatoxina se mantuvieron entre los 0.19 y 0.77 µg/kg con un total del 56% de sus muestras positivas durante el 2008 y un 43% para el 2009 donde solo cinco de sus muestras llegaron a niveles entre los 1.44-7.14 µg/kg, siendo estos valores más bajos a los reportados en nuestro estudio.

Otro estudio enfocado a la detección de microorganismos fúngicos y micotoxinas existentes en ensilaje de maíz encontró que esta micotoxina (AF) fue la que se presentó en menores concentraciones ya que al analizar sus muestras mediante ELISA obtuvo una concentración en un rango de  $2.47 \pm 0.21$  µg/kg con una concentración máxima de 10.18 µg/kg (Biro, et

al., 2009). En vacas productoras de leche la exposición constante a micotoxinas puede genera un factor de riesgo para la salud animal ya que el consumo prolongado de estas micotoxinas puede llegar a desencadenar diferentes alteraciones tanto metabólicas, inmunológicas y hormonales (Fink-Gremmels, 2008).

Con respecto al efecto del secuestro, derivado de la absorción de la micotoxina por el agente secuestrante los resultados obtenidos en nuestro estudio demuestran una eficacia en la absorción de AF del 71.5% en el grupo al cual se le adiciono el secuestrante a base de *Saccharomyces cerevisiae* estos resultados del efecto del secuestrante fueron mayores a los encontrados por (Diaz, et al., 2004) el cual evaluó *in vitro* seis diferentes tipos de secuestrantes en donde los elaborados a base de glucomananos extraídos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* mostraron tener una eficacia de absorción del 59% contra AF totales mientras que el resto de los agentes secuestrante mantuvieron un porcentaje de absorción entre el 31 y 65% en alimento destinado para consumo de vacas productoras de leche, sin embargo otros investigadores evaluaron la eficacia de este mismo tipo de secuestrante específicamente contra AFB<sub>1</sub> en donde el porcentaje de absorción se incrementó hasta el 96% en su evaluación en laboratorio (Diaz, et al., 2002), otro estudio evaluó en un modelo *in vitro* a base de fluido ruminal el potencial de secuestro de estas levaduras contra AFB<sub>2</sub> encontrando que a mayor tiempo de exposición del secuestrante con la micotoxina el efecto del secuestro a las 3 horas de exposición es de tan solo el 28% pero este mismo se va incrementando paulatinamente hasta alcanzar a las 12 hr un 92.3% de absorción (Akkaya & Bal, 2012). Doggi et al., (2011) obtuvieron un porcentaje de absorción de entre el 40 y 94% pero el efecto se mantuvo más estable cuando se sometía a un pH de 8 en donde se mantenía entre el 81-86% mientras que las muestras que sometió a un pH 6 el cual es similar al pH ruminal solo logro absorber entre el 49 y 51% de la micotoxina presente. Gallo et al., (2010) señala que el pH y el tipo de solvente son un factor crítico para que se lleve a cabo la capacidad reducción de los  $\beta$ -glucanos los cuales son un componente importante de la capa interna de la pared celular de este tipo de levadura para la absorción de micotoxinas complejas Armando et al., (2012), menciona que las diferencias existentes en la evaluación del efecto secuestrante es muy variante y que el efecto obtenido *in vitro* no siempre es indicativo de las respuestas que se pudieran llevar a cabo en experimentos *in vivo*.

## **6.2 ALTERACIONES BIOQUÍMICAS OCASIONADAS POR LA PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN ALIMENTO**

Diverso autores señalan que entre algunos de los parámetros hematológicos y bioquímicos evaluados normalmente para verificar la eficacia de los agentes de desintoxicación se encuentran las proteínas totales, albúmina, globulinas, creatinina y la actividad enzimática de fosfatasa alcalina, gama-glutamyl-transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), glutatión reducido y transferasas de glutatión los cuales son indicadores de los efectos adversos de las micotoxinas y demuestran la acción destoxicante de los absorbentes (Denli, et al., 2009; Gallo & Masoero, 2010; Armando, et al., 2012).

Algunos autores han sugerido que la alteración en la concentración de proteínas séricas en diferentes especies animales se debe a una disminución de la síntesis hepática ocasionada por el daño tóxico de las AFs en el hígado (Denli, et al., 2009). Se ha reportado que la presencia de AFs disminuye la concentración de albumina y tiempo de protrombina en terneros con toxicidad crónica por AF (63 d) (Pierezan, et al., 2012). Denli et al., (2009) señala que las alteraciones en la síntesis de proteínas es ocasionado cuando las AFs forman aductos con el ADN y RNA produciendo una degranulación del retículo endoplásmico rugoso, impidiendo así la síntesis de ARN y originando una disminución en la síntesis de proteínas a nivel de hígado así como daños en este órgano. Este efecto se vio reflejado en un estudio donde sometió a varios grupos de animales al consumo de forraje contaminado con AF a niveles que iban desde los las 15 a 400 µg/kg encontrando que a una mayor concentración de aflatoxinas en la dieta la concentración sérica de proteínas totales y albumina disminuía paulatinamente en donde en el grupo expuesto a una menor concentración de AF sus valores de proteínas totales y albumina fueron de 9.2 y 3.4 g/dL respectivamente mientras que para el grupo expuesto a la máxima concentración estos valores fueron de 7.0 y 2.1 g/dL (Bingol, et al., 2007),.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para medir el tiempo de protrombina mostraron que las vaquillas del grupo control tuvieron un incremento en el tiempo de coagulación a comparación del grupo con secuestrante , estos mismos efectos adversos fueron reportados por otros autores (Runciman, et al., 2002) donde se encontró en vaquillas Holstein intoxicadas naturalmente con ensilaje contaminado con dicoumarol un incremento el tiempo

de coagulación en los animales intoxicados, registrando valores comprendidos desde los 71 a 96 segundos y asociándolo al efecto de esta toxina sobre diferentes factores de coagulación. Otros estudios reportaron que el aumento en el tiempo de coagulación depende de la dosis y tiempo de exposición a la AF. De la misma manera, el aumento del tiempo de protrombina se relaciona con el grado de daño hepático y la cantidad de AF ingerida; estos autores obtuvieron un incremento en el tiempo de protrombina en corderos expuestos a 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AF en el alimento durante un periodo de tres semanas (Fernández, et al., 1995). Bruchim et al. (2012) reportaron el mismo daño hepático en otras especies, debido a una exposición accidental de AF en la dieta (80-300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Las alteraciones causadas en el tiempo de coagulación por aflatoxicosis son generadas por a una reducción en el tiempo de protrombina debido que se ven afectados los factores II, VII, IX y X de coagulación (Upcott, 1970). En cabras, Bingol et al. (2007) mostraron una correlación negativa entre las concentraciones de albumina y tiempo de protrombina y el consumo de forrajes naturalmente contaminados con AF. Efectos similares se han reportado en pollos de engorda (Denli, et al., 2009) y ratas (Abdel-Wahhab, et al., 2002) que ingirieron alimento contaminado con AFB<sub>1</sub> purificada. La disminución en la concentración sérica de tiempo de protrombina y albumina en nuestro estudio, sugieren que el incremento en el consumo de AF es capaz de inducir daño hepático y una reducción en la síntesis de proteínas. En un estudio realizado en vacas lecheras durante dos diferentes gestaciones se evaluaron diferentes parámetros bioquímicos (TP, ALB, AST, GGT y ALP) para su capacidad como indicadores séricos del algún desequilibrio en la homeostasis del animal, encontrando que estas variables respondían de manera eficaz cuando los animales se encontraban sometidos a un estrés calórico, en donde los valores de proteínas totales y albumina tienden a disminuir, mientras que la actividad de cada una de las diferentes enzimas se ve incrementada (Abeni, et al., 2007). Los resultados obtenidos por cada uno de estos diferentes autores son similares a los obtenidos en nuestro estudio en donde la concentración sérica de Albumina y de las proteínas totales se mayormente disminuida en los animales del grupo Control los cuales estuvieron expuestos de forma crónica a una mayor concentración de aflatoxinas en el alimento, mientras que los animales del grupo Secuestrante de ambas UPL sufrieron un menor daño por las AF.

La actividad enzimática específica (AEE) en suero mostro diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre todos grupos de estudio; donde los animales del grupo Control tuvieron una actividad específica más alta para ALP, AST, ALT y superaron los valores de referencia de la AEE establecidos para bovinos (Kaneko, 1980; Dubreuil & Lapierre, 1997). Efectos similares se han mostrado en otros estudios; reportaron un aumento significativo de GGT ( $p < 0.05$ ) en vacas Holstein intoxicadas con AFB<sub>1</sub> en comparación con los valores registrados inicialmente (26.5 vs 29.5 U/L) (Masoero, et al., 2007). Abdel-Wahhab et al. (2002) reportaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en ratas expuestas a AF (2.5 mg/kg de peso corporal) en comparación con los animales de control. Estudios en humanos reportan alteraciones en la función hepática en personas expuestas a AF en las observando un incremento proporcional de estos valores a medida que se incrementa la concentración de AF sérica (Mohajeri, et al., 2014). Aunque, algunos investigadores no ha encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de enzimas hepáticas en vacas lecheras expuestas experimentalmente a AFB<sub>1</sub> en un desafío a corto plazo (7 d) (Xiong, et al., 2015). En general, se ha declarado que el aumento de actividad enzimática específica de ALP, AST, ALT y GGT en suero puede considerarse como un indicador general de los daños causados por diferentes procesos patológicos en vacas lecheras (Liu, et al., 2012). Otros autores señalan que el aumento de AEE podría considerarse un biomarcador para la función hepática en vacas lecheras (Stojevic, et al., 2005). En nuestro estudio, el aumento de la AEE observado en bovinos de ambas UPL sugiere un efecto adverso de la exposición crónica AF, en donde a mayor concentración de AF se presenta un incremento en la actividad enzimática específica de vacas lecheras.

La concentración de glutatión reducido detectado en suero mostro tener diferencias estadísticas entre animales de los grupos Control y Secuestrante en donde los niveles registrados para los animales del grupo control fueron tres veces superior al valor promedio de los animales del grupo Secuestrante. En este sentido, se ha demostrado que la aflatoxina es un potente agente hepatotóxico que durante su biotransformación genera un compuesto llamado AF-epóxido; este compuesto es altamente reactivo y se une a proteínas y ácidos nucleicos (Essigmann, et al., 1982; Eaton & Gallagher, 1994; Kuilman, et al., 2000). El mecanismo más importante para prevenir la unión del epóxido a las macromoléculas es la conjugación del GSH con el epóxido de AF (Eaton & Gallagher, 1994); esta reacción es

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

catalizada por el epóxido hidrolasa y GST. Se ha demostrado que GST y otras enzimas involucradas en la síntesis de GSH se produjeron como resultado de la inducción de la actividad enzimática específica (Shepherd, et al., 2000). Por lo tanto, el equilibrio en la concentración final de GSH se encuentra regulado por la inducción de su síntesis y los procesos de desintoxicación; el fenómeno anterior se ha demostrado en células de ganado vacuno expuestas in vitro a AFs (Bernabucci, et al., 2011). Bernabucci et al. (2011) suponen que la exposición a AFs es capaz de inducir una reducción dependiente de la dosis de GSH la cual podría ser causada debido a una disminución en la síntesis de proteínas y un aumento de la actividad GST. Por lo tanto, los resultados de nuestro estudio sugieren que el aumento de los niveles de GSH y GST en animales de ambas UPL, fue una respuesta de emergencia a la exposición constante a la AF; como resultado del proceso de desintoxicación de la aflatoxina a través de la conjugación mediada por GST con GSH.

La diferencia en la reportada en nuestro estudio en cuanto a la valoración de la función hepática mediante la cuantificación de la actividad enzimática entre ambos grupos, en donde se observó un mayor incremento en los animales del grupo control, mientras que en el grupo Secuestrante de las dos UPL el efecto adverso causado por la exposición crónica a AF fue menor, siendo atribuible al efecto quimioprotector de esta levadura debido a la capacidad que tienen de unirse a la aflatoxina impidiendo de esta manera su bioactivación por parte del animal (Armando, et al., 2012).

### **6.3 ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS OCASIONADAS POR LA INFECCIÓN DE *Neospora caninum*.**

Dubey et al. (2007) reportan a nivel mundial una alta prevalencia de neosporosis en ganado lechero (10-65%) manifestándose mediante problemas reproductivos y presencia de abortos en explotaciones lecheras. A nivel local la prevalencia ante *Neospora caninum* es similar a lo reportado a nivel mundial y en otros estados del país, ya que se han reportado prevalencias desde el 32-100% en ganado lechero (García-Vázquez, et al., 2002; Cruz-Vázquez, et al., 2008).

Diverso autores reportan un incremento en los niveles de IgG total en vacas naturalmente infectadas con *N. caninum* en comparación con animales seronegativos, siendo más altos estos niveles en vacas con abortos ocasionados por este protozooario (Andrianarivo, et al.,

2005 ). Otros estudios muestran un incremento en los niveles de IgG en vacas Holstein gestantes infectadas experimentalmente al confirmarse el diagnóstico de gestación en donde a partir del día 21 de inoculación se incrementaron las IgG y se mantuvieron así durante el resto de la gestación y con la ocurrencia de abortos en estos animales los animales seronegativos mantuvieron bajos niveles de IgG durante todo el estudio y llevaron su gestación a término (Bartley, et al., 2013). Resultados similares fueron reportados en vacas Holstein (Regidor-Cerrillo, et al., 2014) inoculadas a 70 días de gestación mostrando un incremento en los niveles de IgG (36% IRPC) 21 días después del inoculo. Datos similares fueron encontrados en nuestro estudio, donde los animales seropositivos a *Neospora* mostraron valores de IgG totales más altos que los animales seronegativos en los grupos de ambas UPL. En este sentido Bartley et al. (2013) menciona que posterior a la infección con *N. caninum*, tanto las vacas como los fetos desencadenan respuestas inmunes mediadas por células humorales e innatas específicas.

Se ha asociado la protección del feto contra la infección por *N. caninum* mediante la producción de IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IFN- $\gamma$  durante la gestación en vacas lecheras (Almería, et al., 2009). Andrianarivo et al. (2005) indican que en vacas gestantes la respuesta inmune es mediada principalmente por la producción de IgG<sub>2</sub>. Otros estudios llevados a cabo en bovinos infectados han demostrado la evolución de la respuesta inmune humoral ante esta infección, reportando que la producción de IgM específicas se genera rápidamente (12 p.i.) mientras que la producción de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> se producen de forma más tardía (Lunden, et al., 1998). La avidéz de las inmunoglobulinas específicas para *N. caninum* refleja la duración de la infección aumentando durante el transcurso de la infección y permaneciendo constantemente alta en un estado crónico de la enfermedad (Björkman, et al., 2003). Otros estudios indican una correlación entre el incremento en los niveles de anticuerpos específicos (IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub>) y virulencia (baja, moderada y alta) de aislados de *N. caninum* (Jiménez-Ruiz, et al., 2013). Nuestro estudio reportó resultados similares en el incremento de los niveles de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> los cuales fueron más altos en los animales positivos a *Neospora* y siendo IgG<sub>2</sub> la más elevada debido a la cronicidad de la infección en vacas gestantes; se ha reportado que el conocimiento de esta relación en el incremento de inmunoglobulinas como IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>2</sub> específicas contra *Neospora* podría ayudar como indicador en la predicción del aborto en animales infectados naturalmente (Almería, et al., 2009).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Estudios realizados muestran una correlación positiva entre la respuesta inmune específica mediante IgG<sub>2</sub> y el incremento en la producción de INF- $\gamma$  contra *N. caninum* observada en los toros con infección crónica lo cual sugiere una respuesta inmunológica predominante tipo Th1 (Ferre, et al., 2005). Resultados similares fueron reportados en vaquillas gestantes por otros autores, donde se observó una respuesta IgG<sub>2</sub> predominante y niveles altos de INF- $\gamma$  séricos (Hecker, et al., 2013). Otros estudios han demostrado que la inmunidad mediada por células y en particular el IFN- $\gamma$  tiene un papel importante en la protección materno-fetal contra la fase intracelular (taquizoíta) del parásito que se multiplica rápidamente, donde las vacas bajo estudio durante su gestación y positivas a *N. caninum* tuvieron altos niveles de INF- $\gamma$  (Bartley, et al., 2012). Resultados similares se encontraron en nuestro estudio, donde los animales seropositivos a *N. caninum* tuvieron altos niveles de IgG<sub>2</sub> e INF- $\gamma$  al igual que los animales que cambiaron su estatus serológico a lo largo del estudio, mostrando así el efecto inmunológico ante la reinfección o primo infestación ocasionada por este protozoario en donde la respuesta inmune es indicativa de una infección crónica.

La evaluación de los antígenos específicos de las fases infectantes de *Neospora caninum* es sumamente importante debido a que sus resultados nos expresan el desarrollo de la enfermedad. Estudios han revelado que los antígenos de taquizoíta (NcSAG<sub>4</sub>; antígenos de superficie) se encuentran relacionados con la fase aguda de la enfermedad, mientras que los antígenos del bradizoíta (NcGRA<sub>7</sub>; antígenos de los gránulos densos) asociados con infecciones crónicas, los cuales son capaces de generar una respuesta inmune adecuada debido a su alta capacidad inmunogénica (Fuchs, et al., 1998; Alvarez- García, 2003; Aguado-Martínez, et al., 2009). Jiménez-Ruiz et al (2013) reportan una correlación positiva entre altas concentraciones de anticuerpos NcGRA<sub>7</sub> con una elevada virulencia por parte del parásito, debido a que es una proteína que juega un papel importante en el proceso de invasión celular del protozoario (Aguado-Martínez, et al., 2009). Otros autores encontraron en vacas infectadas experimentalmente y con ocurrencia de abortos niveles séricos elevados de IgG<sub>2</sub> y NcGRA<sub>7</sub>, reportando que altos niveles de estas moléculas podrían ser indicativos de una infección activa, pudiendo llegar a utilizarse como biomarcadores ante posibles recurrencias de abortos (Hiasa, et al., 2012; Jiménez-Ruiz, et al., 2013).

#### **6.4 INTERACCIÓN EXPOSICIÓN CRÓNICA A AFLATOXINAS EN LA DIETA Y EXPOSICIÓN NATURAL A *Neospora caninum*.**

Este estudio describió cambios en los parámetros hematológicos, inmunológicos y reproductivos relacionados con la ingestión a largo plazo de alimentos naturalmente contaminados con aflatoxinas en concentraciones por debajo de los niveles de establecidos a nivel nacional (20.0 µgAF/kg); en interacción con la infección natural por *Neospora caninum* y el seguimiento de esta infección crónica durante 2 gestaciones. En las vacas lecheras que ingirieron el nivel más alto de AF se observaron cambios significativos en la incidencia de aborto, alteraciones en el proceso de coagulación, hipoproteinemia y aumento de la actividad específica de las enzimas de desintoxicación contra aflatoxinas. Por otro lado, las vacas lecheras que ingirieron el nivel más bajo difirieron ligeramente de los valores de referencia bioquímicos. Estos resultados sugieren que el consumo a largo plazo de alimentos que contienen bajas concentraciones de aflatoxinas también puede producir efectos adversos en el rendimiento y la salud animal, lo que es consistente con una aflatoxicosis subclínica.

Con respecto a la infección natural crónica de *Neospora caninum* se observaron que las vacas seropositivas tuvieron un mayor incremento en los parámetros inmunológicos evaluados durante el estudio (IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, NcSAG<sub>4</sub>, NcGRA<sub>7</sub>) en comparación con las vacas seronegativas durante la primera gestación; sin embargo se encontró una seroconversión en estos animales del 21 y 54%, demostrando alta capacidad del parásito para infectar animales en una explotación y disminuyendo el número de animales negativos a esta enfermedad. Durante la segunda gestación el comportamiento en los parámetros inmunológicos evaluados fue similar a la gestación anterior, siendo más elevados en animales seropositivos que en los seronegativos, viéndose incrementando el porcentaje de seroconversión al término de esta segunda gestación con una prevalencia del 70 al 75 % en los animales clasificados sanos ante esta enfermedad; Mostrando además que la transmisión congénita endógena es un factor esencial para el establecimiento de la enfermedad en una explotación lechera.

Aunque todos estos resultados obtenidos muestran un verdadero efecto en relación a la ingesta de aflatoxinas en la dieta y sus repercusiones en la alteración de parámetros bioquímicos; efecto similar observado en las alteraciones inmunológicas y las presencias de *Neospora caninum*. De manera independiente cada uno de ellos demuestra cada uno de los efectos adversos que han sido demostrados en diferentes estudios, sin embargo al tratar de

relacionar el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas y la reactivación e infección por *Neospora caninum* los resultados no son concluyentes debido a que la evaluación de esta interacción de forma natural puede verse alterada por una serie de diversos factores tanto extrínsecos como intrínsecos que deberían de tomarse en cuenta para la realización de estudios posteriores, siendo de suma importancia el establecer un grupo Control el cual no consuma ninguna cantidad de aflatoxinas en la dieta y que sean seronegativos a *Neospora* durante todo el estudio, para poder validar los resultados obtenidos. Es importante señalar que este tipo de estudio experimental es prácticamente difícil de llevarse a cabo, por lo costoso del estudio y lo fácilmente que se puede contaminar el alimento con AF e infectarse el animal con este parásito.

Alunizando cada una de las variables estudiadas y su efecto esperado para la observación de los efectos toxicogénicos en una exposición crónica a aflatoxinas y la infección natural a *Neospora caninum* todos los resultados muestran un efecto adverso ocasionado ante estos dos problemas, los cuales al ser analizados de manera conjunta mediante modelos estadísticos confirman la interacción de la exposición a aflatoxinas y la infección y reactivación de *Neospora* durante la gestación de vacas Holstein. Por tal motivo esta investigación es de gran importancia ya que nos brinda una observación aproximada a la situación natural de estos dos factores tan comunes en la industria pecuaria destinada a la producción láctea y que ocasiona pérdidas económicas elevadas por la presencia de estos dos problemas. Los resultados de este estudio permiten proporcionar al productor pecuario información necesaria para el diagnóstico, prevención y control de ambos problemas, permitiéndole minimizar los riesgos y obtener así mejores ganancias. Efecto que fue observado en este estudio y aunque no se tenía contemplado dentro de la metodología establecida para esta investigación, una de las explotaciones decidió implementar el uso de secuestrante de micotoxinas en la dieta de las vacas productoras debido a las pérdidas económicas registradas y obteniendo a mediano plazo una mejora económica y en la salud de los animales, lo cual se registró en nuestro estudio a partir de la segunda gestación.

## 7. CONCLUSIONES

Los efectos toxicológicos a la exposición crónica a aflatoxinas en vacas Holstein ocasionaron alteraciones bioquímicas en el tiempo de protrombina, proteínas totales, albumina y en la actividad enzimática específica (ALT, AST, ALP, GGT, GST y GSH), siendo más significativos en los animales que consumieron una mayor concentración de AF en la dieta durante ambas gestaciones, estas alteraciones surgen como resultado del daño ocasionado por las aflatoxinas a nivel hepático.

La infección natural a *Neospora caninum* en animales seropositivos y seronegativos a esta enfermedad reportó una seroconversión elevada de los animales negativos durante el desarrollo de este estudio, donde el más del 75% de los animales clínicamente sanos, terminaron afectados con la presencia de este parásito.

Las pruebas inmunológicas realizadas en los animales para evaluar la respuesta inmune ante la infección de *Neospora caninum* mostraron diferencias significativas en los animales seropositivos donde se observó un incremento en los niveles de IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, NcSAG<sub>4</sub>, NcGRA<sub>7</sub> con respecto al grupo seronegativo como resultado de la reactivación en animales parasitados y la respuesta inmune de un animal sano al contacto, exposición y establecimiento de esta enfermedad.

Los resultados en conjunto muestran que las vacas infectadas con *Neospora caninum* y expuestas a mayores concentraciones de aflatoxinas en la dieta, tienen mayores probabilidades de presentar abortos durante la gestación o manifestar algún otro problema reproductivo antes o después de gestación; así como manifestar diversas alteraciones en la química sanguínea resultado de un proceso tóxico. Ocasionando pérdidas económicas a los productores pecuarios debido a una disminución en la producción lechera y el incremento en días abiertos, intervalo entre partos, servicios por concepción y abortos.

Debido a lo extenso de estos problemas y a repercusiones en el hato lechero, se sugiere seguir realizando investigaciones de campo y experimental con la finalidad de poder determinar la relación existente entre el consumo de aflatoxinas, la reactivación de este protozoario y su posterior diseminación.

## 8. REFERENCIAS

1. Abdel-Wahhab, M. A., Nada, S. A. & Khalil, F. A., 2002. Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxin-contaminated diet with or without sorbent materials. *Animal Feed Science and Technology*, Volumen 97, pp. 209-219.
2. Abeni, F., Calamari, L. & Stefanini, L., 2007. Metabolic conditions of lactating Friesian cows during the hot season in the Po valley. 1. Blood indicators of heat stress. *International Journal of Biometeorology*, Volumen 57, pp. 87-96.
3. Aguado-Martínez, A. y otros, 2005. Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, p. 17:442–450.
4. Aguado-Martínez, A. y otros, 2008. Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, Volumen 157, pp. 182-195.
5. Aguado-Martínez, A. y otros, 2009. Failure of a vaccine using immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7 against neosporosis in mice. *Vaccine*, Volumen 27, p. 7331–7338.
6. Akkaya, M. R. & Bal, M. A., 2012. Efficacy of Modified Yeast Extract and HSCAS Containing Mycotoxin Adsorbent on Ruminal Binding. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, Volumen 6, pp. 951-953.
7. Almberg, E. y otros, 2009. A serological survey of infectious disease in Yellowstone National Park's canid community. *PLoS One*, p. 4:7042.
8. Almería, S. & López-Gatius, F., 2013. Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. *Research in Veterinary Science*, Volumen 95, p. 303–309.
9. Almería, S. y otros, 2009. Specific anti-*Neospora caninum* IgG1 and IgG2 antibody responses during gestation in naturally infected cattle and their relationship with gamma interferon production. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Volumen 130, pp. 35-42.
10. Alvarez- García, G., 2003. *Identificación y caracterización de antígenos de “Neospora caninum” con interés inmunodiagnóstico en bovino*. Madrid: s.n.
11. Alvarez-García, 2003. *Identificación y caracterización de antígenos de “neosporea caninum” con interés inmunodiagnóstico en bovinos*. Madrid, España: s.n.
12. Alvarez-García, G. y otros, 2013. Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary Parasitology*, Volumen 198, pp. 85-95.
13. Andrianarivo, A. G. y otros, 2005. Immune responses during pregnancy in heifers naturally infected with *Neospora caninum* with and without immunization. *Parasitol Res*, Volumen 1, pp. Andrianarivo AG1, Anderson ML, Rowe JD, Gardner IA, Reynolds JP, Choromanski L, Conrad PA..
14. Andrianarivo, A. G. y otros, 2000. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v./i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int.J.Parasitol*, Volumen 30, pp. 985-990.
15. AOAC, 1995. Association of Official Agricultural Chemistral Official Methods. *Natural Toxins*, p. 45.

16. AOAC, 2000. AOAC International. *Official Methods of Analysis. 17th ed.* AOAC International, Gaithersburg, MD.
17. AOAC, 2005. Association of Official Agricultural Chemistral Official. Method 2000.08. Aflatoxin M1 in liquid milk, immunoaffinity column by liquid chromatography. *Natural Toxins*, pp. 45-47.
18. Armando, M. y otros, 2012. Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology*, p. 256–264.
19. Bansal, J. y otros, 2011. Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, Volumen 6, pp. 767-774.
20. Barling, K. y otros, 2000. Association of serologic status for *Neospora caninum* with post weaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* , p. 217:1356–1360.
21. Barr, B. y otros, 1998. Neosporosis: its prevalence and economic impact. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, p. 20:1–16.
22. Bartels, C. J. M., Wouda, W. & Schukken, Y., 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* , p. 52:247–257.
23. Bartels, C. y otros, 2006. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum* associated abortion epidemics. *Preventive Veterinary Medicine*, p. 77:186–198.
24. Bartley, P. M. y otros, 2013. Development of maternal and foetal immune responses in cattle following experimental challenge with *Neospora caninum* at day 210 of gestation. *Veterinary Research*, Volumen 44, pp. 91-112.
25. Bartley, P. M. y otros, 2012. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. *Veterinary Research*, pp. 1-12.
26. Bautista, A. & Santos, S., 2004. *Manual de Técnicas de muestreo para manejadores de recursos naturales*. s.l.:Universidad Nacional Autónoma de México. ISBN 970-30-1778-8.
27. Bernabucci, U. y otros, 2011. Aflatoxin B1 and fumonisin B1 affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology in Vitro*, Volumen 25, pp. 684-691.
28. Betina, V., 1994. Physiological regulation of secondary metabolism, In Betina V (Ed), Bioactive secondary metabolite of microorganisms. *Process in industrial microbiology*, pp. 66-80.
29. Bingol, N. T., Tanritanir, P., Dede, S. & Ceylan, E., 2007. Influence of aflatoxin present in forages and concentrated feedingstuffs on milk and some serum biochemical parameters in goats. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, Volumen 51, pp. 65-69.
30. Biro, D. y otros, 2009. Occurrence of microscopic fungi and mycotoxins in conserved high moisture corn from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, Volumen 16, pp. 227-232.

31. Björkman, C. y otros, 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*, Volumen 1, pp. 3-7.
32. Björkman, C. & Ugglá, A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, Volumen 29, pp. 1497-1507.
33. Black, R., McVey, D. & Oehme, F., 1992. Immunotoxicity in the bovine animal. *Veterinary & Human Toxicology*, pp. 438-442.
34. Bruchim, Y. y otros, 2012. Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet in 50 dogs. *Research in Veterinary Science*, Volumen 93, pp. 279-287.
35. Bucio, C., Guzman, D. & Peña, J., 2001. Aflatoxin synthesis in corn fields in Guanajuato, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología.*, pp. 83-87.
36. Buck, B. & Osweiler, D., 1981. *Toxicología veterinaria clínica y diagnóstica*. Zaragoza: Acriba.
37. Butkeraitis, C., 2008. El efecto de las micotoxinas en rumiantes. *Revista Producción Animal*, pp. 1-4.
38. Camarillo, S., Ruvalcaba, M. & Vázquez, C., 2002. *Tópicos en Parasitología Veterinaria Volumen VI: Protozoarios*. Morelos. México.: Universidad Autónoma de Morelos.
39. Carranza, T., 2006. Integración horizontal y vertical de la cadena productiva leche del Estado de Aguascalientes. *Tesis de doctorado en ciencias pecuarias Universidad Autónoma de Aguascalientes Posgrado interinstitucional en ciencias pecuarias*, pp. 12-53.
40. Carranza, T. y otros, 2007. Competitividad de la cadena productiva de leche del estado de Aguascalientes, México... *Agrociencia*, pp. 41: 701-709.
41. Carranza, T., Valdivia, A., Flores, A. & Cámara, C., 2009. Competitividad de la cadena productiva de leche del estado de Aguascalientes, México.. *Boletín del Sistema Nacional de Información Estadística y Geográfica*, pp. 2:158-168.
42. Carrillo, L., 2003. Molds and Mycotoxins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 1-24.
43. Charmley, L. & Prelusky, D., 1994. *Decontamination of Fusarium mycotoxins. In: Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins. Miller J.D., Trenholm H.L.(eds.)*. St. Paul, Minnesota: Eagan Press.
44. Chu, F., 1991.. *Detection and determination of mycotoxins. In: Mycotoxins and Phytoalexins, R. P. Sharma and D. K. Salunkhe*. Florida: Boca Raton: CRC.
45. Conzuelo, S. R. y otros, 2011. Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, Volumen 2, pp. 15-24.
46. Cruz-Vázquez, C., 2002. Neosporosis bovina. En: S. D. Rodríguez-Camarillo & M. Fernández-Ruvalcaba, edits. *Tópicos en Parasitología Veterinaria Volumen VI: Protozoarios.*. Cuernavaca, Morelos: Universidad Autónoma del Estado de Morelos, pp. 1-8.
47. Cruz-Vázquez, C. y otros, 2008. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* infection in dogs found in dairy farms and urban areas of Aguascalientes, Mexico.. *Veterinary Parasitology*, Volumen 157, p. 139-143.

48. Denli, M. y otros, 2009. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B1. *Poultry Science*, Volumen 88, pp. 1444-1451.
49. Diaz, D. E. y otros, 2004. Aflatoxin binders II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia*, Volumen 157, pp. 233-241.
50. Diaz, D. E., Hagler, W. M. J., Hopkins, B. A. & Whitlow, L. W., 2002. Aflatoxin binders I: in vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. *Mycopathologia*, Volumen 6, pp. 223-236.
51. Dogi, C., Armando, M. & Ludueña, R., 2011. Saccharomyces cerevisiae strains retain their viability and aflatoxin B1 binding ability under gastrointestinal conditions and improve ruminal fermentation. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, p. 1705–1711.
52. Dumas, B. T., Watson, W. A. & Biggs, H. G., 1971. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica Chimica Acta*, Volumen 31, pp. 87-96.
53. Driehuis, F. & Oude, S., 2001. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review.. *The Veterinary quarterly*, pp. 22: 212-216.
54. Dubey, J., 2003. Review of Neospora caninum and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, pp. 1-16.
55. Dubey, J., Buxton, D. & Wouda, W., 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of comparative athology*, pp. 267-289.
56. Dubey, J., Buxton, D. & Wouda, W., 2006. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *Journal of Comparative Pathology*., pp. 134:267-289.
57. Dubey, J. & Schares, G., 2006. Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, p. 140:1–34.
58. Dubey, J., Schares, G. & Ortega-Mora, L., 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and Neospora caninum. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 323–367.
59. Dubey, J., Schares, G. & Ortega-Mora, L., 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and Neospora caninum. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 323–367.
60. Dubreuil, P. & Lapierre, H., 1997. Biochemistry Reference Values for Quebec Lactating Dairy Cows, Nursing Sows, Growing Pigs and Calves. *The Canadian Veterinary Journal*, Volumen 61, pp. 235-239.
61. Dzidic, A. y otros, 2006. Effects of mycophenolic acid on inosine monophosphate dehydrogenase I and II mRNA expression in white blood cells and various tissues in sheep. *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine*, pp. 163-169.
62. Eaton, D. L. & Gallagher, E. P., 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Volumen 34, pp. 135-172.
63. Ellis, J., McMillan, D. & Ryce, C., 1999. Development of single tube nested polymerase chain reaction assay form the detection of Neospora caninum DNA. *International Journal Parasitology*, pp. 1589-1596.
64. Essigmann, J. M., Croy, R. G., Bennett, R. A. & N., W. G., 1982. Metabolic activation of aflatoxin B1: patterns of DNA adduct formation, removal and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metabolism Reviews*, Volumen 13, pp. 581-602.

65. EUM-SS, E. U. M. S. d. S., 2002. *Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.* México: Diario Oficial de la Federación.
66. European, C., 2002. Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed - Council statement.. *Official Journal Europea Community.*, pp. 10-22.
67. FAO, 2004. *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003; FAO Food and Nutrition.* Italy: FAO.
68. Fernández, A. y otros, 1995. Changes in the prothrombin time, haematology and serum proteins during experimental aflatoxicosis in hens and broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, Volumen 58, pp. 119-122.
69. Ferre, I. y otros, 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology*, Volumen 5, pp. 1504-1518.
70. Fink-Gremmels, J., 2008. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. *The Veterinary Journal*, Volumen 176, pp. 84-92.
71. Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B. & Hemphill, A., 1998. Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites. *Journal Parasitology*, Volumen 84, pp. 753-758.
72. Gallo, A. & Masoero, F., 2010. In vitro models to evaluate the capacity of different sequestering agents to adsorb aflatoxins. *Italian Journal of Animal Science*, Volumen 9, pp. 109-116.
73. Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A. & Galvano, G., 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: a review. *Journal of Food Protection*, pp. 120-131..
74. García, D. y otros, 2003. Competitividad y ventajas comparativas de los sistemas de producción de leche en el estado de Jalisco, México.. *Agrociencia*, pp. 37: 85-94.
75. García, J. & Cotty, P., 2006.. Spatial distribution of *Aspergillus flavus* and its toxigenic strains on commercial cottonseed from south Texas and its relationship to aflatoxin contamination. *Plant Pathology*, p. 358-366.
76. García-Vázquez, Z. y otros, 2002. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes, Mexico.. *Veterinary Parasitology*, Volumen 106, pp. 115-120.
77. Garcia-Vazquez, Z. y otros, 2005. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico.. *Veterinary Parasitology*, Volumen 134, pp. 61-65.
78. Garon, D., 2006. Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 3479-3484.
79. Gella, F. y otros, 1985. A simple procedure for routine determination of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase with pyridoxal phosphate. *Clinica Chimica Acta*, Volumen 153, pp. 241-247.
80. Ghanem, M., Suzuki, T., Akita, M. & Nishibori, M., 2009. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. *Canadian Veterinary Journal*, p. 389-392.
81. González, L., Soriano, J., Molto, J. & Manes, J., 2008. Simple liquid chromatography assay for analyzing ochratoxin A in bovine milk. *Food Chemistry*, pp. 272-276..
82. Goodswen, S. J., Kennedy, P. J. & Ellis, J. T., 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present.. *Infection, Genetics and Evolution*, Volumen 13, p. 133-150.

83. Gornall, A. G., Bardawill, C. S. & David, M. M., 1949. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction.. *The Journal of Biological Chemistry*, Volumen 177:, pp. 751-766.
84. Habig, W. H., Pabst, J. & Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-Transferases. *Journal of Biological Chemistry*, Volumen 249, p. 7130-7139.
85. Hasler, B. y otros, 2006. Simulating the impact of four control strategies on the population dynamics of *Neospora caninum* infection in Swiss dairy cattle. *Preventive Veterinary Medicine* , p. 77:254-283.
86. Hecker, Y. P. y otros, 2013. Immune response and protection provided by live tachyzoites and native antigens from the NC-6 Argentina strain of *Neospora caninum* in pregnant heifers. *Veterinary Parasitology*, Volumen 4, pp. 436-446.
87. Hernández, J., Risco, C. & Donovan, A., 2001. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* , p. 219:632-635.
88. Hiasa, J. y otros, 2012. ELISAs based on rNcGRA7 and rNcSAG1 antigens as an indicator of *Neospora caninum* activation. *Veterinary Parasitology*, Volumen 4, pp. 379-385.
89. Hissin, P. J. & Hilf, R., 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, Volumen 74, p. 214-226.
90. Holcomb, M., Wilson, D., Trucksess, M. & Thompson, H., 1992. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *Journal of Chromatography*, pp. 341-352.
91. Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O. & Dutler, H., 2001. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*, pp. 179-188.
92. Hye-Jin, A., K.I., S., Dae-Yong, K. & Ho-Woo, N., 2003. ELISA detection of IgG antibody against a recombinant major surface antigen (Nc-p43) fragment of *Neospora caninum* in bovine sera. *The Korean Journal of Parasitology*, pp. 175-177.
93. IARC, 1993. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. *International Agency for Research of Cancer (IARC) monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, pp. 56, 245-489..
94. IARC, 2002. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. *International Agency for Research of Cancer (IARC) monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, pp. 171-301.
95. IFCC, 1983. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5: IFCC methods for alkaline phosphatase.. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, Volumen 21, pp. 731-748.
96. IFCC, 2002. IFCC Primary reference Procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 6. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of  $\gamma$ -Glutamyltransferase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Volumen 40, pp. 734-738.
97. IFCC, 2010. IFCC reference procedures for measurement of catalytic concentrations of enzymes: corrigendum, notes and useful advice. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Volumen 48, pp. 615-621.
98. INEGI, I. N. d. E. y. G., 2007. *Censo agropecuario 2007*. s.l.:s.n.

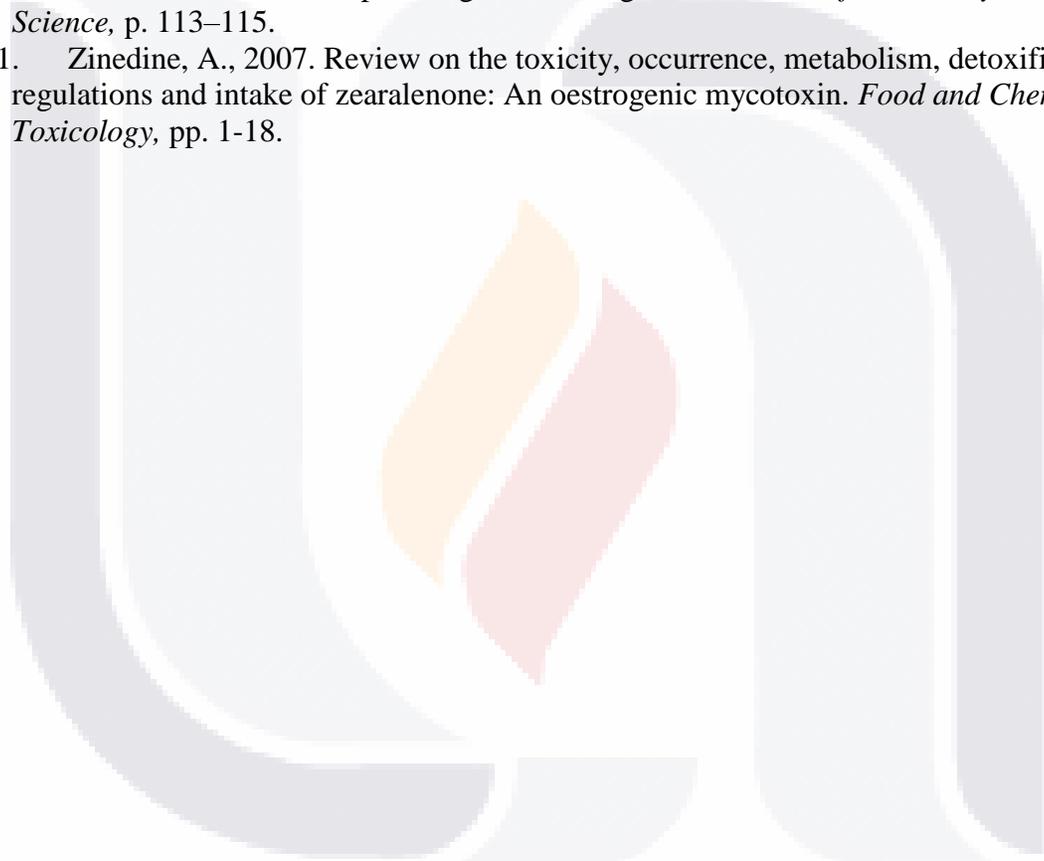
99. International, A., 2008. *Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edition*. Gaithersburg: AOAC International..
100. Jaramillo, J., Rincón, S. & Rico, M., 2009. *Toxicología ambiental*. México: Textos universitarios.
101. Jiménez-Ruiz, E. y otros, 2013. Specific antibody responses against *Neospora caninum* recombinant rNcGRA7, rNcSAG4, rNcBSR4 and rNcSRS9 proteins are correlated with virulence in mice. *Parasitology*, Volumen 5, pp. 569-579.
102. Johansson, A. y otros, 2000. Testing Shelled corn for aflatoxin, Part III: Evaluating the performance of aflatoxin sampling plans.. *Journal of AOAC International*, pp. 1279-1284.
103. Johnson, L. y otros, 2002. Corn silage management: effects of maturity, inoculation, and mechanical processing on pack density and aerobic stability. *Journal of Dairy Science*, pp. 434-44.
104. Kaneko, J., 1980. *Clinical biochemistry of domestic animals*. New York: Academic Press.
105. Kuilman, M. E., Maas, R. F. & Fink-Gremmels, J., 2000. Cytochrome P450-mediated metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1 in bovine hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, Volumen 14, pp. 321-327.
106. Lee, J. K., Chang, H. J. & Chun, H. S., 2010. Protective Effect of Volatile Extract from *Pinus densiflora* against Aflatoxin B-1-induced Oxidative Stress in HepG2 Cells.. *Food Science and Biotechnology*, Volumen 19, pp. 229-233.
107. Liu, P. y otros, 2012. Activities of Aspartate Aminotransferase, Alanine Aminotransferase, Gamma-Glutamyltransferase, Alkaline Phosphatase in Plasma of Postpartum Holstein Cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, Volumen 11, pp. 1270-1274.
108. Lunden, A., Marks, J., Maley, S. W. & Innes, E. A., 1998. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*.. *Parasite Immunology*, Volumen 20, pp. 519-526.
109. Maragos, C. & Busman, M., 2010. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, pp. 688-700.
110. Maragos, C., Plattner, R. & Miklasz, S., 1996. Determination of hydrolysed fumonisin B-1 (HFB1) in corn by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay. *Food Additives & Contaminants* , pp. 105-113.
111. Marinho, M. y otros, 2007. Função hepática e renal de frangos de corte alimentados com dietas com aflatoxinas e clinoptilolita natural. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, pp. 1221-1225.
112. Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G. & Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, Volumen 60, pp. 218-237.
113. Masoero, F. y otros, 2007. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, Volumen 1, pp. 1344-1350.
114. Medina-Esparza, L., Cruz-Vázquez, C., Quezada, T. & Morales, E., 2006 . Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary Parasitology* , Volumen 136 , p. 187-191.

115. Medina, L., 2008. *Transmisión vertical/horizontal de Neospora caninum en un hato natalmente infectado*. Aguascalientes: Tesis de doctorado en ciencias pecuarias Universidad Autónoma de Aguascalientes. .
116. Mohajeri, G., Norouzian, M. A., Mohseni, M. & Afzalzadeh, A., 2014. Changes in blood metals, hematology and hepatic enzyme activities in lactating cows reared in the vicinity of a lead-zinc smelter. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Volumen 92, pp. 693-697.
117. Molina, A. y otros, 2004. Silage as a livestock feed source. *Revista del Centro de Investigación*, pp. 66-71.
118. Muhammet, A. y otros, 2011. Seroprevalence of Antibodies Against Neospora caninum in Cows in Van Province. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, pp. 767-771.
119. Newman, K., 1998. *The biochemistry behind esterified glucomannans titrating mycotoxins out of the diet*. In: *Biotechnology in the feed Industry, Proceedings of Alltech's 14th Annual symposium*. Nottingham : T. P. Lyons and K. A. Jacques.
120. Ortega-Mora, L., Gottstein, B. & Conraths, F., 2007. *Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control*. Madrid: Cabi Publishing.
121. Oude, E. & Driehuis, F., 2001. Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Electronic conference on Tropical silage*, pp. 1-28.
122. Palumbo, J. & O'keeffe, T., 2008. Microbial interactions with mycotoxigenic fungi and mycotoxins. *Toxin Reviews*, p. 27:261-285.
123. Paulo, A., Haddad, D. I. & VanLeewen, J., 2005. A review of Neospora caninum in dairy and beef cattle a Canadian perspective. *Canadian Veterinary Journal*, p. 230-243.
124. Phillips, S. y otros, 1996. The mycoflora and incidence of aflatoxin, zearalenone and sterigmatocystin in dairy feed and forage samples from Eastern India and Bangladesh. *Mycopathologia* , pp. 15-21.
125. Phillips, T., Sarr, A. & Grant, P., 1995. Selective chemisorption and detoxification of aflatoxins by phyllosilicate clay. *Journal of Natural Toxins*, pp. 204-213.
126. Pierezan, F. y otros, 2012. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Volumen 36, pp. 607-618.
127. Pittet, A., 1998. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Revue de Médecine Vétérinaire*, pp. 479-492.
128. Piva, G., Galvano, F., Pietri, A. & Piva, A., 1995. Detoxification methods of aflatoxins: a review. *Nutrition Research*, pp. 689-715.
129. Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B. & Sobin, L. H., 1994. *Laboratory methods in histotechnology*. Washington, D.C.: The American Registry of Pathology. Armed Forces Institute of Pathology.
130. Queiroz, O. C., Han, J. H., Staples, C. R. & Adesogan, A. T., 2012. Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M<sub>1</sub> concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B<sub>1</sub>-contaminated diet.. *Journal of Dairy Science*, Volumen 95, pp. 5901-5908.
131. Quick, A. J., 1935. A study of the coagulation defect in haemophilia and in Jaundice. *The American Journal of the Medical Sciences*, Volumen 190, p. 501;.
132. Quiroz, R., Figueroa, C., Ibarra, V. & López, A., 2011. *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.

133. Quiroz, R., Figueroa, C. & López, A., 2009. Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos.. *Memorias del VIII Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria.*, p. 175.
134. Ramos, A. & Hernández, E., 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilication addition to feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, pp. 197-206.
135. Razmi, G., 2009. Fecal and Molecular Survey of *Neospora caninum* in Farm and Household Dogs in Mashhad Area, Khorasan Province, Iran.. *The Korean Journal of Parasitology*, pp. 417-420.
136. Regidor-Cerrillo, J. y otros, 2014. *Neospora caninum* infection during early pregnancy in cattle: how the isolate influences infection dynamics, clinical outcome and peripheral and local immune responses. *Veterinary Research*, pp. 1-15.
137. Regidor-Cerrillo, J. y otros, 2010. Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model.. *Veterinary Research*, pp. 41-52.
138. Reichel, M. P. y otros, 2014. Control options for *Neospora caninum*--is there anything new or are we going backwards?. *Parasitology*, Volumen 141, pp. 1455-1470.
139. Reichel, P., Ayanegui-Alcérreca, M., P.L.F., G. & Ellis, T., 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – The. *International Journal for Parasitology*, p. 43:133–142.
140. Reyes-Velazquez, W. y otros, 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, pp. 182-185.
141. Reyes-Velázquez, W. y otros, 2009. Total aflatoxins in cows feed and AFM1 in milk in dairy herds from Jalisco State, Mexico. *Técnica Pecuaria México*, pp. 223-230.
142. Rodrigues, I., Handl, J. & Binder, E. M., 2011. Mycotoxin occurrence in commodities, feeds and feed ingredients sourced in the Middle East and Africa. *Food Additives & Contaminants: Part B*, Volumen 4, pp. 168-179.
143. Roigé, M. y otros, 2009 . Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Southeastern Buenos Aires Province, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, pp. 233-237.
144. Romero-Salas, D. y otros, 2010. Seroprevalence of *Neospora caninum* Antibodies en Cattle in Veracruz, Mexico.. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, Volumen 9, pp. 1445-1451.
145. Rosalki, S. B., Foo, A. Y. & Burlina, A., 1993. Multicenter evaluation of iso-ALP test kit for measurement of bone alkaline phosphatase activity in serum and plasma. *Clinical Chemistry*, Volumen 39, pp. 648-652.
146. Rosbottom, A. y otros, 2008. Upregulation of cytokines is detected in the placentas of cattle infected with *Neospora caninum* and is more marked early in gestation when fetal death is observed. *Infection and Immunity*, pp. 2352-2361.
147. Rosbottom, A. y otros, 2011. Up regulation of the maternal immune response in the placenta of cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *PLoS One*, pp. 1-9.
148. Rosbottom, A. y otros, 2007. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. *Parasite Immunology*, pp. 219-228.
149. Runciman, D. J., Lee, A. M., Reed, K. F. & Walsh, J. R., 2002. Dicoumarol toxicity in cattle associated with ingestion of silage containing sweet vernal grass (*Anthoxanthum odoratum*). *Australian Veterinary Journal* , Volumen 80, pp. 28-30.

150. SAGARPA, 2015. Boletín de leche. México: SAGARPA: Centro de Estadística Agropecuaria.
151. Scott, P., 1998. Industrial and farm detoxification processes for mycotoxins. *Revue de Médecine Vétérinaire*, pp. 543-548.
152. Scudamore, K. & Livesey, C., 1998. Occurrence and significance of mycotoxins in forage crops and silage: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. 1-17.
153. Shepherd, A. G., Manson, M. M., Ball, H. W. & McLellan, L. I., 2000. Regulation of rat glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase) subunits by chemopreventive agents and in aflatoxin B1-induced preneoplasia. *Carcinogenesis*, Volumen 21, pp. 1827-1834.
154. Sohn, C. y otros, 2011. Identification of novel proteins in *Neospora caninum* using an organelle purification and monoclonal antibody approach. *PLoS ONE*, pp. 1-12.
155. Stenlund, S. y otros, 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, pp. 227-234.
156. Steyn, P., 1995. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicology Letters*, pp. 843-851..
157. Stojevic, Z. y otros, 2005. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Veterinarski Arhiv*, Volumen 75, pp. 67-73.
158. Takayama, H., Shimada, N., Mikami, O. & Murata, H., 2005. Suppressive effect of deoxynivalenol, a *Fusarium* mycotoxin, on bovine and porcine neutrophil chemiluminescence: An in vitro study. *The Journal of Veterinary Medical Science*, pp. 531-533.
159. Teimouri, Y. y otros, 2004. Effects of alfalfa particle size and specific gravity on chewing activity, digestibility, and performance of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, pp. 3912-3924.
160. Thurmond, M., Anderson, M. L. & Blanchard, P. C., 1995. Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. *The Journal of Parasitology*, p. 364-367.
161. Torres-Pacheco, I., 2011. *Aflatoxins – Detection, Measurement and Control*. Croacia: InThec.
162. Upadhaya, S. y otros, 2009. Comparative study on the aflatoxin B1 degradation ability of rumen fluid from Holstein steers and Korean native goats. *Journal of Veterinary Science*, Volumen 10, p. 29-34.
163. Upadhaya, S. y otros, s.f.
164. Upcott, D. H., 1970. Blood coagulation defects in calves fed on toxic groundnut (aflatoxin). *Zentralbl Veterinarmed A*, Volumen 17, pp. 278-283.
165. US-FDA, 1994. *Compliance Policy Guides (CPG) 7126.33 Sec. 683.100 - Action Levels for Aflatoxin in Animal Feeds, Issued Nov 21, 1979, reissued Oct 1, 1980, Revised Aug 15, 1982, May 18, 1989, and Aug 28, 1994*. EUA: United States of America-Federal Drug Agency, Office of Regulatory Affairs (ORA).
166. Vitela-Mendoza, I., Cruz-Vázquez, C. & Ramos-Parra, M., 2004. Identificación de las causas de desecho en cinco establos lecheros de Aguascalientes, México. *Técnica Pecuaria México*, Volumen 42, pp. 437-444.

167. Williams, J. y otros, 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions.. *The American Journal of Clinical Nutrition*, pp. 80:1106-1122.
168. Wouda, W., Bartels, C. & Moen, A., 1999. Characteristics of Neospora caninum-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995–1997). *Theriogenology*, p. 233–245.
169. Xiong, J. L. y otros, 2015. Transfer of dietary aflatoxin B1 to milk aflatoxin M1 and effect of inclusion of adsorbent in the diet of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Volumen 98, pp. 2545-2554.
170. Yu, X., Chen, N., Hu, D. & Zhang, W., 2009. Seroprevalence of Neospora caninum and Coexistence with Toxoplasma gondii in Dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, p. 113–115.
171. Zinedine, A., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, pp. 1-18.



## 9. ANEXOS

Anexo	Contenido
1	Carta de aceptación de artículo científico.
2	Artículo científico.
3	Técnica para cromatografía líquida de alta presión para AF en maíz.
4	Técnica para ensayo inmunoenzimático para AF en alimento.
5	Técnica para la medición del tiempo de tiempo de protrombina.
6	Técnica para la cuantificación de proteínas totales.
7	Técnica para la cuantificación de albúmina.
8	Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de Gamma-glutamyltranspeptidasa.
9	Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de Gamma-glutamyltranspeptidasa.
10	Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de alanina aminotransferasa.
11	Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de aspartato aminotransferasa.
12	Técnica para la cuantificación de glutatión reducido.
13	Técnica para la cuantificación de transferasas de glutatión.
14	Técnica para la detección de anticuerpos contra Neospora caninum.
15	ELISA NcIgG, NcIgG1 e NcIgG2.
16	ELISA SAG4, GRA7.
17	ELISA de avidéz.
18	Técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
19	Pruebas diagnósticas en fetos abortados histopatología.
20	Pruebas diagnósticas en fetos abortados PCR.

### 9.1. ANEXO 1. Carta de aceptación de artículo científico.

Prof. Carlos G. Gutiérrez <vetmexicooa@gmail.com>

Para: Dr Arturo Gerardo Valdivia-Fores

CC: Emmanuel Hernandez-Valdivia, Carlos Cruz-Vazquez, Ma. Consolacion Martinez-Saldaña, Teodulo Quezada-Tristan, Raul Ortiz-Martinez y 2 más...

13 feb a las 14:17

Dr Arturo Gerardo Valdivia-Fores:

We have reached a decision regarding your submission to Veterinaria México OA, "Reproductive and biochemical changes in long-term exposure to low-level aflatoxins in feed and transfer to milk of dairy cows".

Our decision is to:

Thank you for submitting your discoveries to Veterinaria Mexico OA. We find that your article suggests an interesting advance in Veterinary Science.

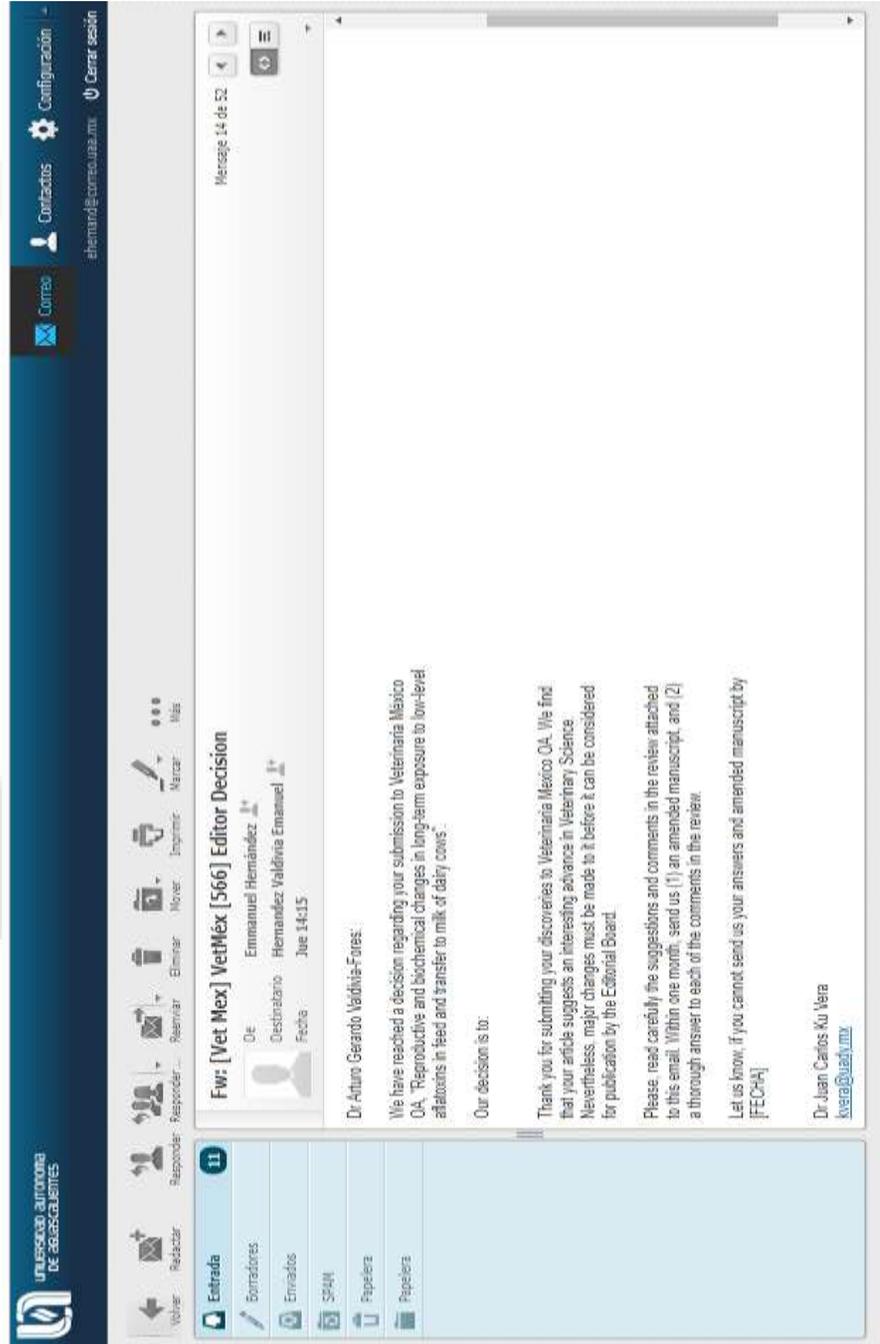
Nevertheless, major changes must be made to it before it can be considered for publication by the Editorial Board.

Please, read carefully the suggestions and comments in the review attached to this email. Within one month, send us (1) an amended manuscript, and (2) a thorough answer to each of the comments in the review.

Let us know, if you cannot send us your answers and amended manuscript by  
[FECHA]

Dr Juan Carlos Ku Vera

[kvera@uady.mx](mailto:kvera@uady.mx)





**9.2. ANEXO 2. Artículo científico.**



26

**Introduction**

27 Aflatoxins (AF) are toxic secondary metabolites worldwide produced by the fungi of  
28 *Aspergillus section Flavius*; they are potent mycotoxins, which contaminate a variety of  
29 agricultural commodities.<sup>1</sup> The AF have widely demonstrated their carcinogenic,  
30 teratogenic and mutagenic potential.<sup>2</sup> In addition, the AF develop synergistic effects with  
31 different pathogenic agents.<sup>3-4</sup>

32 Ingested AF are quickly absorbed from the gastrointestinal tract and bio-transformed  
33 by the hepatic mixed-function oxidase system, forming highly reactive epoxides.<sup>5</sup> The  
34 epoxides bind the nucleophilic cell sites forming adducts,<sup>6</sup> they have been found to be  
35 the cause of impaired protein formation, and alterations of blood coagulation  
36 (prothrombin time, PT) and immune function.<sup>7-8</sup> The plasma enzymes specific activity  
37 (ESA) are increased when cell-bound enzymes are released into the bloodstream.  
38 Therefore, changes in ESA of  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase  
39 (ALP), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) are  
40 suggestive of liver disease induced by aflatoxin.<sup>9-9</sup> Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) is the main  
41 derivative of AF formed in the liver.<sup>9</sup> It has been established that the AFB<sub>1</sub> present in the  
42 diet of lactating cows can be excreted through milk as AFM<sub>1</sub> at a one to six percent rate.<sup>10</sup>

43 The detoxification of AF epoxides occurs through its conjugation with reduced  
44 glutathione (GSH) mediated by the ESA of glutathione-S-transferase (GST).<sup>11</sup> AF-GSH  
45 conjugates are then excreted as a less-toxic form of mercapturic acid in bile.<sup>12</sup> Induction  
46 of GST activity and enhancement of GSH levels by *de novo* GSH synthesis result from  
47 AF exposure.<sup>8,13</sup>

48 The clinical Aflatoxicosis forms depend on the ingested dose and exposure time.<sup>14</sup>  
49 Field outbreaks of acute Aflatoxicosis occur in bovines exposed to high amounts (1.1-  
50 33.5 mg/kg) of AF.<sup>15-16</sup> Even though clinical manifestations of chronic Aflatoxicosis are  
51 less evident, they have been characterized in episodes associated with an intake of  
52 moderate levels (0.1-0.8 mg/kg) of AF; however, diagnosis is problematic because the  
53 clinical manifestations and lesions are unspecific and the delayed onset of them prevents  
54 their association with AF exposure.<sup>17-19</sup> In addition, it has been assumed that subclinical  
55 aflatoxicosis may be the result of ingestion of the lowest levels of AF in contaminated  
56 food in the long term; although this toxicosis often occurs without overt clinical signs and  
57 its existence is only identified by instrumental techniques such as HPLC of the FA  
58 content in the diet.<sup>19-20</sup>

59 One of the most common strategies to control AF contamination is to set the  
60 maximum residue levels (MRL) or the action levels for AF, which are the maximum  
61 concentrations permitted of AF in food or feed.<sup>1</sup> The European Commission (EC) has

26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61

**Introduction**

Aflatoxins (AF) are toxic secondary metabolites worldwide produced by the fungi of *Aspergillus* section *Flavus*; they are potent mycotoxins, which contaminate a variety of agricultural commodities.<sup>1</sup> The AF have widely demonstrated their carcinogenic, teratogenic and mutagenic potential.<sup>2</sup> In addition, the AF develop synergistic effects with different pathogenic agents.<sup>3-4</sup>

Ingested AF are quickly absorbed from the gastrointestinal tract and bio-transformed by the hepatic mixed-function oxidase system, forming highly reactive epoxides.<sup>5</sup> The epoxides bind the nucleophilic cell sites forming adducts,<sup>6</sup> they have been found to be the cause of impaired protein formation, and alterations of blood coagulation (prothrombin time, PT) and immune function.<sup>7-8</sup> The plasma enzymes specific activity (ESA) are increased when cell-bound enzymes are released into the bloodstream. Therefore, changes in ESA of  $\gamma$ -glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) are suggestive of liver disease induced by aflatoxin.<sup>6-8</sup> Aflatoxin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) is the main derivative of AF formed in the liver.<sup>9</sup> It has been established that the AFB<sub>1</sub> present in the diet of lactating cows can be excreted through milk as AFM<sub>1</sub> at a one to six percent rate.<sup>10</sup>

The detoxification of AF epoxides through its conjugation with reduced glutathione (GSH) mediated by the ESA of glutathione-S-transferase (GST).<sup>11</sup> AF-GSH conjugates are then excreted as a less-toxic form of mercapturic acid in bile.<sup>12</sup> Induction of GST activity and enhancement of GSH levels by *de novo* GSH synthesis result from AF exposure.<sup>6,13</sup>

The clinical Aflatoxicosis forms depend on the ingested dose and exposure time.<sup>14</sup> Field outbreaks of acute Aflatoxicosis occur in bovines exposed to high amounts (1.1-33.5 mg/kg) of AF.<sup>15-16</sup> Even though clinical manifestations of chronic Aflatoxicosis are less evident, they have been characterized in episodes associated with an intake of moderate levels (0.1-0.8 mg/kg) of AF; however, diagnosis is problematic because the clinical manifestations and lesions are unspecific and the delayed onset of them prevents their association with AF exposure.<sup>17-18</sup> In addition, it has been assumed that subclinical aflatoxicosis may be the result of ingestion of the lowest levels of AF in contaminated food in the long term; although this toxicosis often occurs without overt clinical signs and its existence is only identified by instrumental techniques such as HPLC of the FA content in the diet.<sup>19-20</sup>

One of the most common strategies to control AF contamination is to set the maximum residue levels (MRL) or the action levels for AF, which are the maximum concentrations permitted of AF in food or feed.<sup>1</sup> The European Commission (EC) has

62 fixed it at 5.0 µg/kg of AF in dairy cow feed and 50 ng/kg of AFM<sub>1</sub> in milk; however, in  
 63 many countries such as the United States of America (USA), Mexico and Brazil, the MRL  
 64 are set at 20 µg/kg for AF in dairy feed and 500 ng/kg for AFM<sub>1</sub> in milk. China, Japan  
 65 and Korea apply an intermediate level (10.0 µg/kg), but India, Nepal and Senegal have  
 66 higher MRL for AF in the dairy feed (> 20.0 µg/kg).<sup>1-3,21,22</sup> Even though these regulations  
 67 are intended to protect human health and avoid toxicity in animals, there is lack of  
 68 evidence of the effect that an extended exposure to low levels of AF could have on animal  
 69 health, which seems to be the most representative type of exposure in the field.<sup>21,23-24</sup>

70 The objective was to assess the changes in biochemistry values and reproductive  
 71 performance over a long-term natural exposure to several low AF concentrations.

72  
 73 **Materials and methods**

74  
 75 **Ethics statement**

76 The conditions of animal accommodation and general care agreed to the Federation of  
 77 Animal Science Societies recommendations.<sup>25</sup> The research protocol of the study and  
 78 derived activities were reviewed, approved and supervised by the Bioethics Committee  
 79 of the Universidad Autónoma de Aguascalientes.

80  
 81 **Survey design**

82 The observational and non-experimental study was accomplished in a dairy farm  
 83 selected in the central Mexico highlands (21°48'N, 102°03' W; 1966-2008 mamst; semi-  
 84 temperate climate). The herd had 839 heifers and 2,753 cows with an average of 26.9  
 85 (kg/d) of the daily yield of raw milk per milking cow. Ninety Holstein heifers were randomly  
 86 selected at the time of their first successful artificial insemination; they were aged  
 87 between 14 and 15 months (395 ± 10 kg BW). Heifers sample size was calculated for a  
 88 finite population without replacements to estimate the proportion of cows with a change  
 89 in reproductive or biochemical values (95% confidence interval; 10% accuracy; n = 87 +  
 90 5.0% by unexpected culling). During the first and second pregnancies (26 months), the  
 91 selected heifers were followed in successive pens, which were allocated according to  
 92 pregnancy advancement and milk production level.

93  
 94 **Herd management and feeding**

95 The farm had cows in mechanic milking line, with non-induced estrus and artificial  
 96 insemination. Data on gestation, calving, daily milk production, abortions and culling by  
 97 the reproductive failure of the selected animals were registered, and conception rate for

98 first artificial insemination and inter-pregnancy interval were estimated. The cow housing  
99 was in open yards with metallic fences and shaded rest areas with free access to feeders.  
100 The basal diet was served twice a day with a mechanized mixer-distribution cart as a  
101 total mixed ration (TMR). The TMR was formulated to satisfy the recommended nutrient  
102 requirements according to the National Research Council (NRC 2001).<sup>29</sup>

103 The daily dry matter intake (DMI), metabolizable energy and crude protein was  
104 gradually increased according to weight gain in heifers and the increment of milk  
105 production in cows (Table 1). Even though ingredients and proportions varied, the typical  
106 administered diet was made with concentrate and corn silage as well as three different  
107 types of hay (alfalfa, triticale and oat/maize). The concentrates were locally acquired in  
108 the feed factory of the local Milk Producers Association feed factory, whereas the corn  
109 silage and hay were harvested in the same farm. The concentrated feed was prepared  
110 through the integration of diverse ingredients such as sorghum, dry corn grain, rolled  
111 corn, cottonseed, salt, mineral and vitamins.

112  
113

#### 114 *Feed, milk and blood sampling*

115 The samples were obtained and analyzed at monthly intervals. The TMR samples were  
116 obtained directly from each feeder by the techniques indicated by Mexican standards;<sup>27</sup>  
117 five representative samples (1.0 kg each) were selected in a zigzag pattern inside the  
118 feeder, with a 2.0 m distance between each sampling point to obtain the total sample (5  
119 kg). Feed samples were dried (oven with forced air circulation OF- 22G Jeol-Tech Lab  
120 Companion, Korea), homogenized and ground (continuous operation universal mill FM  
121 series 10 Basic, IKA -Wenke, Germany). The samples were kept under refrigeration (4-  
122 5°C) until processed (< 3 weeks).

123 Milk samples (300 mL) were collected from the two daily milking of each cow. The  
124 samples were thoroughly mixed in proportion to the amount of milk yield from each  
125 milking, aliquoted and stored at -20°C until AFM<sub>1</sub> analysis (< 3 days). Cow's blood  
126 samples were collected monthly by puncture of the medial coccygeal vein using  
127 Vacutainer tubes without or with anticoagulant (sodium citrate). Samples were  
128 centrifuged (2500 rpm for 5 min) to obtain serum or plasma and stored in polypropylene  
129 vials (2 mL) at -20°C until analysis (< 48 h).

130

#### 131 *Aflatoxins analysis*

132 The feed samples were processed in solid phase extraction tubes (Supelclean LC-CN,  
133 Supelco, Bellefonte, PA, USA), and extracted AF were derivatized with trifluoroacetic

134 acid and injected into an HPLC system (ProStar binary pump and FP-2020 fluorescence  
 135 detector, Varian Associates Inc., Australia; Supelcosil LC-18 column, 5- $\mu$ m particle size,  
 136 250 x 4.6 mm i. d. and LC-18 guard column, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)  
 137 according to the 990.33 AOAC method.<sup>26</sup> HPLC was performed under the following  
 138 conditions: 360 nm excitation and 440 nm emission for fluorescence detection;  
 139 acetonitrile: methanol: water (1:1:2, vol/vol/vol) for mobile phase; 1.0 mL/min of flow rate;  
 140 20  $\mu$ L of injected sample on methanol: acetic acid 0.5% (1:1), and  $25 \pm 2$  °C of  
 141 temperature.

142 The defatted milk samples were processed via immunoaffinity chromatography  
 143 columns (AflaTest, Vicam, Milford, MA, USA) and the AFM<sub>1</sub> concentration was quantified  
 144 by HPLC (Perkin-Elmer 200 series, Shelton CT, USA, with 200 LC Isocratic pump and  
 145 200a fluorescence detector; reverse-phase C-18 column, 5- $\mu$ m particle size, 250 x 4.6  
 146 mm i. d., Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA) according to the AOAC method 2000.08  
 147 (AOAC 2000). The AFM<sub>1</sub> concentration was fulfilled under the following HPLC  
 148 conditions: 366 nm excitation and 416 nm emission for fluorescence detection; methanol:  
 149 water (initial 1:100 to final 90:10, vol/vol, 20 min) for mobile phase; 0.6 mL/min of flow  
 150 rate; 20  $\mu$ L of injected sample in methanol-water (50:50, vol/vol), and  $25 \pm 2$  °C of  
 151 temperature.

152 In HPLC assay, AF quantitation was performed using a calibration curve of purified  
 153 AF (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> and M<sub>1</sub>; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). This curve was used to  
 154 compute the AF content in sample extracts. The recovery percent of AF content was  
 155 estimated at  $\approx$  86% and the coefficient of variation was  $\approx$  7%. The lower detection limits  
 156 (LDL) were of 0.3 and 0.05  $\mu$ g/kg for AF and AFM<sub>1</sub>, respectively. AFB<sub>1</sub> had the highest  
 157 concentration ( $78 \pm 14$  %) in feed, while B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> presented only residual  
 158 concentrations (5, 6 and 12 %, respectively) in all studied samples.

159  
 160 **Other mycotoxins analysis**

161 The TMR was sampled and analyzed for mycotoxins zearalenone (ZEN), ochratoxin  
 162 (OTA), fumonisins (FBs) and deoxynivalenol (DON) via competitive ELISA kits (COKAQ  
 163 5100, 2000, 3000 and 4000; AgraQuant, Romer Labs, Union, MO, USA), according to  
 164 the manufacturer's instructions. The LDL were 25.0, 2.0, 250 and 250  $\mu$ g/kg feed,  
 165 respectively.

166  
 167 **Biochemical tests**

168 Reduced glutathione was quantified by fluorometry (Perkin Elmer Luminescence  
 169 Spectrometer LS-50B, Waltham, MA, USA) according to a standard method.<sup>26</sup>

170 Prothrombin time (PT) was performed using a commercial kit (Tcoag, TriniCLOT-PT  
 171 Exel, Ireland). The specific activity of GST was quantified by spectrophotometric  
 172 methods.<sup>20</sup> GST was expressed as  $\mu\text{mol}$  of 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene (CONB,  
 173  $\text{min}/\text{mg}/\text{protein}$ ).

174 The determinations of total protein (TP) and albumin (ALB) concentration in serum  
 175 were carried out according to standard methods;<sup>26-32</sup> and ESA of ALT, GGT, AST, and  
 176 ALA were determined by IFCC methods.<sup>29-32,33-38</sup> Using appropriate diagnostic kits, these  
 177 compounds were tested according to the manufacturers' instructions (Biosystems,  
 178 Spain: Total Protein, Albumin/ALB, ALP-AMP, AST/GOT, ALT/GPT,  $\gamma$ -GT; Cod. 11500,  
 179 11547, 11598, 11567, 11568, 11520, respectively). These parameters were determined  
 180 in a UV-Vis spectrophotometer (Varian DMS-80, Australia).

181

182 *Statistical analysis*

183 Based on the quantification of the natural AF level ingested into the diet, the cows were  
 184 monthly assigned to group A, B, C or D ( $<5.0$ ,  $5.0-9.9$ ,  $10.0-19.9$  and  $\geq 20.0$   $\mu\text{g}/\text{kg}$  AF,  
 185 respectively), according to the usual MRL set in many countries.<sup>1</sup> Allowing these AF  
 186 groups, the one-way ANOVA procedure was used to determine if there were any  
 187 statistically significant differences between the means of following data: AFM<sub>i</sub> in milk,  
 188 AFM<sub>i</sub> transfer, calving, abortions, culling by reproductive failure, conception rate to first  
 189 artificial insemination, inter-pregnancy interval, daily milk production, DMI, and serum or  
 190 plasma biochemistry. Bonferroni multiple comparison test for adjusting the unequal  
 191 sample sizes was used to determine significant differences between means of AF  
 192 exposure groups.

193 The calculation of AFM<sub>i</sub> transfer to milk was performed as follows:<sup>10</sup>

194 
$$\text{Transfer (\%)} = \text{AFM}_i \text{ excretion } (\mu\text{g/d}) / \text{AF consumption } (\mu\text{g/d}) \times 100$$

195 Reproductive and biochemical data were analyzed by linear regression procedure  
 196 to associate the variability of these dependent variables as a single function of the AF  
 197 concentration in TMR. In addition, mixed effects were analyzed via general linear model  
 198 procedure. The statistical model includes the changes in reproductive and biochemical  
 199 variables in function of AF concentration in TMR, date of sampling, and month of  
 200 pregnancy advance nested with number of pregnancy; the data were sorted according  
 201 to these two last factors to ensure sample homogeneity in these noteworthy variables.<sup>9,37</sup>

202 <sup>38</sup> All statements of statistical significance were based on a probability of  $p < 0.05$ .

203

204 **Results and discussion**

205 In this study, deleterious changes were observed in dairy cows naturally exposed to low  
 206 levels of aflatoxins in their diet; blood biochemistry and reproductive performance had  
 207 evident alterations besides the presence of AFM<sub>1</sub> in milk. These changes were consistent  
 208 with a subclinical Aflatoxicosis. To our knowledge, the long term (>2 yr.) of natural  
 209 exposure to low AF concentrations represents the first report of this approach in dairy  
 210 cows. The presence of AF in feed is highly relevant in the dairy industry to decrease the  
 211 large and negative impact that this mycotoxin produces on performance, animal health  
 212 and on milk contamination with AFM<sub>1</sub>.

213  
 214 **Mycotoxins in feed**

215 During the study, 99 % of samples (308/312) of the dairy diets were naturally  
 216 contaminated with detectable AF levels (Figure 1). The frequency and AF concentration  
 217 of contaminated TMR samples among the groups A, B, C and D (25, 35, 23 and 17 %;  
 218 3.5, 7.1, 13.5 and 50.7 µg/kg) showed statistically significant differences (P <0.01). In  
 219 this non-experimental study, the natural AF contamination levels were variables in each  
 220 month and feeder. The detected differences were attributed to the natural variation of AF  
 221 contamination in feedstuffs, likewise the environmental conditions in that each feed batch  
 222 was produced, stored and utilized to prepare the cow diets.

223  
 224 The three-quarters of TMR samples (75 %; 234/312) showed detectable AF levels.  
 225 With the exception of D Group, the detected AF concentrations were within the range  
 226 allowed by the local Mexican Official Standards, which establishes a maximum permitted  
 227 AF concentration of 20 µg/kg in feed for dairy cows ingestion; these levels are permitted  
 228 in several countries also.<sup>1,20</sup> In our study, AF concentrations in the dairy cows' diet were  
 229 comparable to those obtained in other field studies in TMR (4.9 to 24.9 µg/kg) of dairy  
 230 cows in the Central Mexican Highlands.<sup>20</sup> Similar results were obtained in Europe,  
 231 America, the Middle East and Africa.<sup>22-24,40</sup> In a meta-analysis, it has been proposed that  
 232 AF levels less than 300 µg/kg as realistic or representative of field conditions.<sup>24</sup> This  
 233 indicates that the AF concentrations quantified in feedstuffs during this study are similar  
 234 to values obtained by other authors and representative of field conditions; therefore, the  
 235 results of this study agree with the fact that low AF concentrations in feed consumed by  
 236 dairy cows is frequent.

237 Concentrations of OTA, FBs and DON were below the LDL (data not shown), while  
 238 the ZEA concentration was detected sporadically only during months 12, 15, 20, 23 and  
 239 26 of the study (56.3 ± 38.22 µg/kg). In other studies<sup>20-40</sup> on the natural contamination by

240 mycotoxins of the feeds of dairy cows, concentrations below the action levels for OTA,  
 241 FBs, DON and ZEA were found. Similarly in our study, the AF were lower to the  
 242 applicable action levels. In another extended study was concluded that the mycotoxins  
 243 occurrence pattern is highly dependent on the geographical provenance of feed.<sup>24</sup>  
 244 Therefore, the action levels established for OTA, FBs, DON and ZEA in the complete  
 245 diet for dairy cows varies greatly. For instance, the European Union sets maximum limits  
 246 in 250, 50,000, 5,000 and 500 µg/kg (FAO 2004), while USA-permitted maximum levels  
 247 of FBs and DON are 30,000 and 10,000 µg/kg, respectively, but the Food and Drug  
 248 Administration has not established maximum limits for OTA and ZEA.<sup>5</sup>

249 Exposure to high doses of ZEA (10,000-20,000 µg/kg) causes low reproductive  
 250 performance in cattle.<sup>41</sup> Sporadically, small amounts of ZEA were found in this study;  
 251 therefore, it is unlikely that the changes in serum biochemistry and reproductive  
 252 performance could be associated to the ZEA in the feed. These facts suggest that the  
 253 changes were originated by another situation, such as long-term exposure to AF.

254  
 255 **Reproductive performance**

256 Significant differences (P <0.05) were detected in the reproductive parameters of cows  
 257 exposed to higher concentrations of aflatoxins (Group C and D) affecting particularly the  
 258 conception rate to first service, culling rate due to reproductive failures, interval between  
 259 successive pregnancies and the rate of abortions (Table 2). It has previously been  
 260 suggested that the presence of AF in dairy cattle feed is a risk factor for reproductive  
 261 failure since these compounds cause animal immune suppression, which allows the  
 262 reactivation of the pathogenic agents that cause abortions and reproductive disorders  
 263 in cattle.<sup>3</sup> In this regard, some authors has been suggest that constant exposure of dairy  
 264 cows to low AF concentrations can trigger pathological changes in immunity,  
 265 metabolism, and endocrine system.<sup>6</sup> These results suggested that the increase of AF  
 266 intake in the feed is related to alterations in the reproductive parameters.

267  
 268 **Biochemical changes**

269 The groups in our study showed evidence of changes in the selected biochemical  
 270 parameters in comparison to the reference values for cattle (Table 3). This study showed  
 271 a gradual decrease in the serum concentrations of TP as the concentration of AF was  
 272 increased in the feed consumed by the cows. A TP reduction (2.7 g/L per AF µg/kg) in  
 273 the feed and a significant difference (P <0.00) between groups A, B, C and D were  
 274 observed. A similar decrease in ALB serum concentration was observed.

275 Some authors have suggested that the alteration in serum proteins in different  
 276 animal species is due to a decreased hepatic synthesis caused by AF toxic damage in  
 277 the liver.<sup>46</sup> It also reported that AF decreases the concentration of TP and ALB in calves  
 278 with chronic (63 d) AF toxicity.<sup>19</sup> It was showed a negative correlation between TP - ALB  
 279 and AF concentrations in goats that feeding naturally AF-contaminated forages.<sup>7</sup> Similar  
 280 effects have been reported in broilers and rats that ingested feed contaminated with  
 281 purified AFB<sub>1</sub>.<sup>46-47</sup> The decrease in PT and ALB serum concentration detected in our  
 282 study suggests that the chronic AF consumption is capable of inducing hepatic damage  
 283 and a reduction in protein synthesis.

284 During this study, a significant increase ( $P < 0.001$ ) was reported in the PT between  
 285 Groups A, B, C and D, with an increase from 17.7 to 19.7 s, increasing by 0.05 s per  $\mu\text{g}$   
 286 of AF consumed in the feed. Groups C and D cattle had PT values above the reference  
 287 range reported for bovine (11-17 s),<sup>44</sup> while in Groups A and B, animals remained within  
 288 these reference values during the study (Table 3). The alteration of PT in calves has  
 289 been associated with AF intoxication due to its deleterious effect in the synthesis of  
 290 coagulation factors VII, IX and X, resulting in an increased blood coagulation time.<sup>8</sup> Also,  
 291 an increase in PT has been reported in Holstein calves experimentally intoxicated with  
 292 AFB<sub>1</sub> (1.0 mg/kg BW).<sup>48</sup>

293 The increase of the PT is related to the degree of liver damage and ingested AF  
 294 amount in a dose/time-dependent pattern in hens and broiler exposed to 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of  
 295 AF in feed during three weeks.<sup>49</sup> Also, it has been reported that the liver was damaged  
 296 in other species due to accidental exposure to AF in feed (80-300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).<sup>8</sup>

297 The change of PT is evident in other blood coagulation disorders produced by potent  
 298 anticoagulants like dicumarol; for instance, it has been reported an increase of PT (71.8–  
 299 95.4 s) in Holstein heifers that consumed contaminated feed with dicumarol.<sup>44</sup> Alteration  
 300 of the clotting mechanism by AF exposure may explain the hemorrhagic post-mortem  
 301 findings usually detected in field outbreaks in intoxicated cattle with large amounts of AF  
 302 (1.1-33.5 mg/kg).<sup>15-19</sup> Therefore, the increase in the TP of our study suggests that the  
 303 consumption of AF in the feed increases the hazards of suffering alterations in the  
 304 coagulation.

305 This study showed that the serum GSH concentration was significantly different ( $P$   
 306  $< 0.03$ ) between the groups, presenting a gradual increase as the AF concentration in the  
 307 diet was increased ( $2.0 \pm 0.04 - 2.6 \pm 0.03 \text{ nmol} / \text{mL}$ ). The specific activity of GST  
 308 enzyme serum was also different ( $p < 0.001$ ) between each of the groups, an increase of  
 309  $1.5 \mu\text{mol CDNB}/\text{min}/\text{mg protein per mg of AF in diet}$ . GST in groups B, C and D exceeded  
 310 the GST reference values during the study (Table 3).<sup>45</sup>

311 In this sense, it has been shown that AF are a potent hepatotoxic agent that during  
 312 its biotransformation generates an intermediate compound called AF-epoxide; this  
 313 compound is highly reactive and binds itself to proteins and nucleic acids.<sup>5</sup> The most  
 314 important mechanism to prevent the binding of the epoxide to target macromolecules is  
 315 the conjugation of GSH to the AF-epoxide; this reaction is catalysed by the epoxide  
 316 hydrolase and GST.<sup>5</sup> Moreover, it has been demonstrated that GST and other enzymes  
 317 involved in GSH synthesis were produced as a result of the induction of enzymatic  
 318 activity.<sup>13</sup> Therefore, the balance in the GSH final concentration is regulated by its  
 319 synthesis induction and the detoxification processes; the previous phenomenon has  
 320 been demonstrated in cattle cells exposed *in vitro* to AF;<sup>20</sup> in this assay it is assumed  
 321 that the GSH inducement by AF exposure could be caused by a decreased protein  
 322 synthesis and an increased GST activity. Therefore, the results of our study suggest that  
 323 increasing levels of GSH and GST among A-D groups was generated as a response to  
 324 chronic AF exposure and activation of the GST-mediated detoxification process with  
 325 GSH conjugation.

326 The ESA in serum showed significant differences ( $p < 0.05$ ) among all study groups;  
 327 the animals in group D had a higher specific activity for ALP, AST and ALT and exceeded  
 328 the ESA reference values established for cattle.<sup>27,49</sup> Similar effects has been reported a  
 329 significant GGT increase ( $p < 0.05$ ) in Holstein cows intoxicated with AFB<sub>1</sub> in comparison  
 330 to the values recorded initially (26.5 vs 29.5 U/L).<sup>51</sup> As well as, in rats exposed to AF (2.5  
 331 mg/kg BW) compared to control animals, it has been reported significant differences ( $p$   
 332  $< 0.05$ ).<sup>47</sup> However, other authors<sup>19</sup> found no significant differences in the plasma levels  
 333 of liver enzymes, in dairy cows experimentally exposed to AFB<sub>1</sub> in a short-term challenge  
 334 (7 d). Overall, it has been stated that the ESA increase of ALP, AST, ALT and GGT in  
 335 serum may be related as a general indicator of damages caused by different liver  
 336 pathological processes in dairy cows.<sup>52</sup> In our study, the increase in ESA observed in  
 337 cattle of all groups suggests an adverse effect of chronic AF exposure, where the higher  
 338 concentration of AF is an increase in the ESA of dairy cows.

339

340 **AFM1 in milk**

341 The cows from D Group were exposed naturally to a higher dose of AF in the TRM and  
 342 showed a higher concentration of AFM<sub>1</sub> in milk, compared to those from Group A ( $99.7$   
 343  $\pm 2.4$  vs  $15.6 \pm 1.3$  ng/L, respectively;  $p < 0.00$ ). Likewise, cows from Group A had a  
 344 greater rate of AFM<sub>1</sub> transfer to milk (0.74 vs 0.26 %; Table 4). Comparable results have  
 345 also been demonstrated in an experimental study;<sup>20</sup> in this last study it was estimated  
 346 the percentage of transfer AFM<sub>1</sub> in milk at 0.75–2.5% ingested AFB<sub>1</sub> in the feed (55

347  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Also, it has been reported that the consumption of AFB<sub>1</sub> in the feed (3.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )  
 348 produces a contamination of  $15.5 \pm 2.5$  ng/L of AFM<sub>1</sub> in milk. In Holstein cows  
 349 experimentally intoxicated with AFB<sub>1</sub> mixed in the TMR (75  $\mu\text{g} / \text{kg} / 9$  d) the transfer and  
 350 excretion of AFM<sub>1</sub> to milk has been quantified at 0.61% of AFM<sub>1</sub> / AFB<sub>1</sub> and 570 ng / L.<sup>8</sup>  
 351 In other study in dairy cows consuming contaminated feed naturally with AF,<sup>9</sup> it has been  
 352 stated a concentration of AFM<sub>1</sub> excreted in the milk of 10 - 420 ng/L. Also, in dairy cows  
 353 experimentally exposed to different doses of AFB<sub>1</sub> in feed (20 and 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) it has been  
 354 reported an increase of excretion and transfer of AFM<sub>1</sub> into the milk (105 and 208 ng/L;  
 355 0.56 and 0.59%, respectively).<sup>10</sup> In our study, AFM<sub>1</sub> levels into the milk of all groups (15.6  
 356 - 99.7 ng/L) did not exceed MRL set by Mexican or US legislation (500 ng/L). However,  
 357 the AFM<sub>1</sub> in the milk of Groups C and D (58.9 and 99.7 ng/L) exceeded the MRL  
 358 established by the European Commission (50 ng/L).<sup>1</sup>

359 In this study, there was a significant dose-response relationship between the AF  
 360 concentration in feed ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and the AFM<sub>1</sub> concentration in milk (ng/L) ( $p < 0.001$ ;  $R^2$ :  
 361 62 %; Y-intercept:  $19.2 \pm 0.10$  & slope:  $2.70 \pm 0.83$ ). Other studies stated a significant  
 362 linear correlation between AFM<sub>1</sub> content in milk and AF intake in dairy cows;<sup>9</sup> these  
 363 authors establish that the carry-over of AF into the milk as AFM<sub>1</sub> is influenced by feeding  
 364 regimens, cow health, hepatic biotransformation capacity, milk yield amount and other  
 365 physiological factors.

366 The deleterious effects on reproductive performance, sera biochemistry, and AFM<sub>1</sub>  
 367 in milk detected in this study suggest that dairy cows had a subclinical Aflatoxicosis  
 368 induced by the AF ingestion during the long term even though AF concentrations were  
 369 below the action levels. In this sense, some authors have stressed that the setting of  
 370 regulatory guidelines for aflatoxin contamination has been primarily based on legal  
 371 considerations rather than experimental or epidemiological information.<sup>1</sup> These  
 372 discrepancies causing the maximum permissible level for the AF control feed for dairy  
 373 cows differs significantly between countries (0.0-50 mg/kg in feed). Each country seeks  
 374 to establish its own balance between the economic cost of AF control with the benefits  
 375 to public health and productivity in the dairy industry.<sup>1</sup>

376 Reproductive and biochemical changes when cows consumed the highest level of  
 377 AF differ significantly from the lowest level ( $48.6 \pm 1.9$  and  $3.5 \pm 1.4$   $\mu\text{g} \text{ AF} / \text{kg}$  feed);  
 378 even in the latter level, the biochemical reference values differed slightly. Besides, there  
 379 was the presence of AFM<sub>1</sub> in milk. The foregoing is added to the assertion of that no  
 380 level of aflatoxins is completely safe and that increasing of AF levels leads to increased  
 381 risks. In this study, therefore, the criteria of the minimum effective dose (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in feed),

382 which have been established for other animals, could be applied in dairy cattle based on  
383 economic losses.<sup>22,26</sup>

384

385 **Conclusion**

386 This study describes changes in reproductive and hematological parameters related to  
387 the long-term ingestion of AF naturally contaminated feed at four different concentrations  
388 levels. In dairy cows that ingested the higher AF levels during 26 months, significant  
389 changes on incidence of abortion, culling by reproductive failure, and increasing of the  
390 inter-pregnancy interval were observed. Alteration of coagulation process,  
391 hypoproteinemia and increased activity of AF detoxification enzymes, were also  
392 detected. Moreover, transfer and excretion of AFM<sub>1</sub> in milk in a dose-response  
393 relationship with AF concentration in feed were observed. On the other hand, the dairy  
394 cows that ingested the lowest levels differed slightly from the biochemical reference  
395 values and showed the presence of AFM<sub>1</sub> in milk, albeit at a level tolerated by the  
396 applicable regulation. These results suggest that long-term consumption of feed  
397 containing low concentrations of AF can also result in adverse effects on performance  
398 and animal health, which is consistent with subclinical Afatoxicosis.

CONFIDENTIAL

**References**

1. Food and Agriculture Organization. Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003; FAO Food and Nutrition Paper 81. Italy: FAO; 2004.
2. International Agency for Research of Cancer. Aflatoxins. Pages 171–301 in IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 82. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. France: IARC Press; 2002.
3. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin. Microbiol. Rev. 2007;20(2):323–67. doi: 10.1128/CMR.00031-06.
4. Queiroz OC, Han JH, Staples CR, Adesogan AT. Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M<sub>1</sub> concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B<sub>1</sub>-contaminated diet. J. Dairy Sci. 2012;95(10):5901–8. doi: 10.3168/jds.2011-5287.
5. Eaton DL, Gallagher EP. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1994;34:135-72. doi: 10.1146/annurev.pa.34.040194.001031.
6. Marin S, Ramos AJ, Cano-Sanchis G, Sanchis V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. Food Chem. Toxicol. 2013;60:218-37. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.047.
7. Bingöl NT, Tanrıtanır P, Dede S, Ceylan E. Influence of aflatoxin present in forages and concentrated feeding stuffs on milk and some serum biochemical parameters in goats. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 2007;51(1):65–9.
8. Bruchim Y, Segev G, Seia U, Bdolah-Abram T, Salomon A, Aroch I. Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet in 50 dogs. Res. Vet. Sci. 2012;93(1):279–87. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.07.024.
9. Stojevic Z, Piršijn J, Milinković-Tur S, Zdelar-Tuk M, Ljubić BB. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. Vet. Arhiv. 2005;75(1):67–73.
10. Xiong JL, Wang YM, Nennich TD, Li Y, Liu JX. Transfer of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> to milk aflatoxin M<sub>1</sub> and effect of inclusion of adsorbent in the diet of dairy cows. J. Dairy Sci. 2015;98(4):2545–54. doi: 10.3168/jds.2013-7842.
11. Lee JK, Chang HJ, Chun HS. Protective Effect of volatile extract from *pinus densiflora* against Aflatoxin B<sub>1</sub>-induced oxidative stress in HepG2 cells. Food Sci. Biotechnol. 2010;19(1):229–33. doi: 10.1007/s10068-010-0031-0.
12. Quezada T, Jaramillo F, Valdivia AG, Reyes JL, Ortiz R, Rodríguez ML. Comparative study of the concentration of reduced glutathione and the activity of

- gamma-glutamyl-transferase and glutathione transferase in liver and kidneys of broilers and rats. *Vet. Mex.* 2002;33(2):125–35.
13. Shepherd AG, Manson MM, Ball HW, McLellan LI. Regulation of rat glutamate-cysteine ligase (gamma-glutamylcysteine synthetase) subunits by chemopreventive agents and in aflatoxin B<sub>1</sub>-induced preneoplasia. *Carcinogenesis.* 2000;21(10):1827–34. doi: 10.1093/carcin/21.10.1827.
  14. Meggs WJ. Epidemics of mold poisoning past and present. *Toxicol. Ind. Health.* 2009;25(9–10):571–6. doi: 10.1177/0748233709348277.
  15. Melo MM, Nascimento EF, Oliveira NJF. Intoxicação de bovinos por aflatoxina B<sub>1</sub> presente em polpa cítrica: relato de um surto [Intoxication of bovines by aflatoxin B<sub>1</sub> present in citrus pulp: report of an outbreak]. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 1999;51(6):555–8. Portuguese.
  16. Umar S, Munir MT, Shah MAA, Shahzad M, Sohoo MUR, Khan RA, Khan AU, Ameen K, Rafia-Munir A, Saleem F. Outbreak of aflatoxicosis in local cattle farm in Pakistan. *Veterinaria.* 2015;3(1):13–7.
  17. Vald J, Dawra RK, Sharma OP, Negi SS. Chronic aflatoxicosis in cattle. *Vet. Hum. Toxicol.* 1981;23(6):436–8.
  18. Richard JL, Pler AC, Stubblefield RD, Shotwell OL, Lyon RL, Cutlip RC. Effect of feeding corn naturally contaminated with aflatoxin on feed efficiency, on physiologic, immunologic, and pathologic changes, and on tissue residues in steers. *Am. J. Vet. Res.* 1983;44(7):1294–9.
  19. Pierezan F, Oliveira-Filho JC, Carmo PM, Aires AR, Leal MLR, Souza TM, Mallmann CA, Barros CSL. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerras [Experimental aflatoxin poisoning in calves]. *Pesquisa Vet. Brasil.* 2012;32(7):607–18. Portuguese. doi: 10.1590/S0100-736X2012000700004.
  20. Heiferich WG, Garrett WN, Hsieh DP, Baldwin RL. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *J. Anim. Sci.* 1986;62(3):691–6. doi: 10.2527/jas1986.623691x.
  21. Rodrigues I, Handl J, Binder EM. Mycotoxin occurrence in commodities, feeds and feed ingredients sourced in the Middle East and Africa. *Food Addit. Contam. B.* 2011;4(3):168–79. doi: 10.1080/19393210.2011.589034.
  22. Hamilton PB. 1984. Determining safe levels of mycotoxins. *J. Food Prot.* 47(7):570–5.
  23. Montagner M, Bortolazzo E, Ligabue M, Zaghini A. Preliminary study on the presence of aflatoxin B<sub>1</sub> in feeds for lactating cows sampled in the Parmigiano Reggiano production area. *Ital. J. Anim. Sci.* 2005;4(Suppl 2):159–61.

24. Grenier B, Applegate TJ. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins*. 2013; 5:396-430; doi: 10.3390/toxins5020396.
25. Federation of Animal Science Societies Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching, 3rd ed. Champaign, Illinois: Federation of Animal Science Societies; 2010
26. National Research Council (USA). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Washington, District of Columbia: Natl. Acad. Press; 2001.
27. Secretaría de Salud (MX). [Official Mexican Standard NOM-188-SSA1-2002. Products and services. Aflatoxins control in cereals for human and animal consumption. Sanitary specifications]. *Diario Oficial de la Federación, Primera Sección* (2002 Oct 15): 22-41. Accessed 2016 Jul 29. <http://www.salud.gob.mx/unidades/odlnom/188ssa12.html>.
28. Association of Official Analytical Chemists International. *Official methods of analysis*. 17th ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International; 2000.
29. Hissin PJ, Hill R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem*. 1976;74(1):214-26. doi: 10.1016/0003-2697(76)90326-2.
30. Habig WH, Pabel J, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem*. 1974;249(22):7130-9.
31. Gomall AG, Bardawill CS, David MM. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J. Biol. Chem*. 1949;177(2):751-66.
32. Dumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. 1971. *Clin. Chim. Acta*. 1997;258(1):21-30.
33. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 4. IFCC method for gamma glutamyltransferase. *J. Clin. Chem. Clin. Bio*. 1983a;21(10):633-46.
34. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5: IFCC methods for alkaline phosphatase. *J. Clin. Chem. Clin. Bio*. 1983b;21(11):731-48.
35. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Approved recommendations (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2: IFCC method for aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1). *J. Clin. Chem. Clin. Bio*. 1986a;24(7):497-510.

36. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3: IFCC method for alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2). *J. Clin. Chem. Clin. Bio.* 1986b;24(7):481-95.
37. Dubreuil P, Lapierre H. Biochemistry Reference Values for Quebec Lactating Dairy Cows, Nursing Sows, Growing Pigs and Calves. *Can. J. Vet. Res.* 1997;61(3):235-9.
38. Pinedo PJ, De Vries A, Webb DW. Dynamics of culling risk with disposal codes reported by Dairy Herd Improvement dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2010;93(5):2250-61. doi: 10.3168/jds.2009-2572.
39. Reyes-Velázquez WP, Patricio-Martínez S, Isaias-Espinoza VH, Nathal-Vera M, de Lucas-Palacios E, Rojo F. Total aflatoxins in cows feed and AFM, in milk in dairy herds from Jalisco State, Mexico. *Tec. Pecu. Mex.* 2009;47(2):223-30.
40. González-Pereyra ML, Alonso VA, Sager R, Moriaco MB, Magnoli CE, Astoreca AL, Rosa CA, Chiacchiera SM, Dalcerro AM, Cavaglieri LR. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *J. Appl. Microbiol.* 2008;104(4):1034-41. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03634.x.
41. Mohan TR, Malini S. Herbicides, fungicides and rodenticides. *Veterinary Toxicology*. India: Ed. Oxford Book Company; 2010.
42. Ball PJH, Peters AR. *Reproduction in cattle*. 3th ed. United Kingdom: Blackwell Publishing; 2003.
43. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th ed. San Diego, California: Academic Press; 2008.
44. Runciman DJ, Lee AM, Reed KF, Walsh JR. Dicoumarol toxicity in cattle associated with ingestion of silage containing sweet vernal grass (*Anthoxanthum odoratum*). *Aust. Vet. J.* 2002;80(1-2):28-32. doi: 10.1111/j.1751-0813.2002.tb12041.x.
45. Barros L, Braun JP, Galtier P, Toutain PL. Validation of an automated technique for the measurement of glutathione S-transferase in plasma of sheep. *Small Ruminant Res.* 1996;21(1):37-43. doi: 10.1016/0921-4488(95)00815-2.
46. Denil M, Blandon JC, Guynot ME., Salado S, Pérez JF. Effects of dietary AflaDetox on performance, serum biochemistry, histopathological changes, and aflatoxin residues in broilers exposed to aflatoxin B<sub>1</sub>. *Poult. Sci.* 2009;88(7):1444-51. doi: 10.3382/ps.2008-00341.
47. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Khalil FA. Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxin-contaminated diet with or without sorbent materials. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 2002;97(3-4):209-19. doi: 10.1016/S0377-8401(01)00342-X.

48. Osuna O, Edds GT, Blankespoor HD. Toxic effects of aflatoxin B<sub>1</sub> in male Holstein calves with prior infection by flukes (*Fasciola hepatica*). *Am. J. Vet. Res.* 1977;38(3):341-9.
49. Fernández A, Verde MT, Gomez J, Gascon M, Ramos JJ. Changes in the prothrombin time, haematology and serum proteins during experimental aflatoxicosis in hens and broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 1995;58(2):119-22. doi: 10.1016/0034-5288(95)90063-2.
50. Bernabucci U, Colavecchia L, Danielli PP, Basiricò L, Lacetera N, Nardone A, Onchi B. Aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. in Vitro.* 2011;25(3):684-91. doi: 10.1016/j.tiv.2011.01.009.
51. Masoero F, Gallo A, Moschini M, Piva G, Diaz D. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal.* 2007a;1(9):1344-50. doi: 10.1017/S1751731107000663.
52. Liu P, Bao-Xiang H, Xian-Ling Y, Xiao-Lu H, Hai-Yang Z, Yin-Hua H, Nie P, Hui-Fang D, Cheng L. Activities of Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase in plasma of postpartum holstein cows. *J. Anim. Vet. Adv.* 2012;11(8):1270-4. doi: 10.3923/javaa.2012.1270.1274.
53. Diaz DE, Hagler JWM, Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA, Anderson KL, Jones FT, Whitlow LW. Aflatoxin binders II: reduction of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. *Mycopathologia.* 2004;157(2):233-41.
54. Xiong JL, Wang YM, Ma MR, Liu JX. Seasonal variation of aflatoxin M<sub>1</sub> in raw milk from the Yangtze River delta region of China. *Food Control.* 2013;34:703-6. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.06.024.
55. Gizachew D, Szonyi B, Tegegne A, Hanson J, Grace D. Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control.* 2016;59:773-9. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.06.060.
56. Hamilton PB. Aflatoxicosis in farm animals. In: p. 51-57. Zuber MS, Lillehoj EB, Renfro BL ed. *Aflatoxin in Maize: A proceedings of the workshop.* Mexico: CIMMYT; 1987.



Tables and Figures:

Table 1. Feedstuffs and chemical composition of the total mixed ration of dairy heifers and cows during their first and second pregnancies

Item	Amount (kg/ha)	
	Heifers	Cows
<b>Ingredient composition (% of DM)</b>		
Corn silage	32.2-38.5	30.5-38.2
Triticale	32.0-41.2	0.0
Sorghum or corn	1.5-2.5	0.0
Dry oats	2.9-4.2	0.0
Oats as hay	0.0	2.3-4.4
Alfalfa as hay	0.0	12.2-15.5
Cottonseed	0.0	4.4-6.7
Corn molass	0.0	10.1-12.7
Mineral and vitamin mix <sup>1</sup>	1.2-2.3	3.1-3.7
<b>Chemical composition</b>		
DM (%)	43.8-48.3	40.7-48.2
Metabolizable energy (Mcal/kg)	19.6-27.7	7.8-11.7
Crude protein (kg)	1.0-1.4	1.6-2.1
NDF (%)	27.5-29.4	27.2-38.6
ADF (%)	19.7-20.3	16.5-21.3

<sup>1</sup>The mineral and vitamin mix contained 3.5-10.1 % Ca, 4.3-6.7 % Na, 4.8-8.3 % K, 0.2-0.40 % S, 0.2-0.30 % P, 100-1.0 g of vitamin mix/kg DM basis, and 100-1.0 g of vitamin mix/kg DM basis.

CONFIDENTIAL





**Table 3.** Serum biochemical parameters in dairy cows naturally exposed to aflatoxin contaminated diet and linear regression as effect of aflatoxin (AF) in total mixed ration (TMR)

Item	Reference values	Single effect Aflatoxin group (µg/kg)					Mixed effects (P-value)			R <sup>2</sup>	
		A (-5)	B (5-8.5)	C (10-19.5)	D (≥20)	SEM	P-value	Environment (date)	Pregnancy (month)		AF in TMR P-value (%)
Blood samples (No.)	-	594	979	934	233	-	<0.001 <sup>†</sup>	-	-	-	-
Total protein (g/L)	67.4-74.6 <sup>†</sup>	62.5 <sup>*</sup>	63.1 <sup>*</sup>	67.0 <sup>*</sup>	64.5 <sup>*</sup>	0.41	<0.001	<0.001	0.01	0.63	23.3
Albumin (g/L)	30.3-35.0 <sup>†</sup>	30.9 <sup>*</sup>	30.4 <sup>*</sup>	28.8 <sup>*</sup>	28.8 <sup>*</sup>	0.27	<0.001	<0.001	0.04	<0.001	24.8
Prothrombin time (s)	11-17 <sup>†</sup>	17.8 <sup>*</sup>	17.7 <sup>*</sup>	19.2 <sup>*</sup>	20.0 <sup>*</sup>	0.17	<0.001	<0.001	0.81	0.04	8.8
GGT (µmol/L)	2.4-5.0 <sup>†</sup>	3.23 <sup>*</sup>	2.78 <sup>*</sup>	2.18 <sup>*</sup>	1.18 <sup>*</sup>	0.08	<0.001	<0.001	0.10	<0.001	42.7
ALT (U/L)	11-40 <sup>†</sup>	52.0 <sup>*</sup>	60.2 <sup>*</sup>	96.1 <sup>*</sup>	101 <sup>*</sup>	4.7	<0.001	<0.001	0.50	<0.001	5.47
AST (U/L)	75-132 <sup>†</sup>	58.4 <sup>*</sup>	80.9 <sup>*</sup>	93.1 <sup>*</sup>	104 <sup>*</sup>	2.4	<0.001	<0.001	0.53	<0.001	20.0
ALP (U/L)	0-480 <sup>†</sup>	23.4 <sup>*</sup>	33.5 <sup>*</sup>	40.5 <sup>*</sup>	35.0 <sup>*</sup>	1.27	<0.001	<0.001	0.80	<0.001	85.5
GOT (U/L)	24.2-26.7 <sup>††</sup>	31.3 <sup>*</sup>	37.2 <sup>*</sup>	38.4 <sup>*</sup>	41.5 <sup>*</sup>	2.1	0.08	<0.001	1.00	0.04	4.62
GOT (µmol)	2.8-5.5 <sup>†††</sup>	4.5 <sup>*</sup>	5.5 <sup>*</sup>	5.1 <sup>*</sup>	10.1 <sup>*</sup>	0.08	<0.001	<0.001	0.04	<0.001	5.7

Reference values (Larocco et al., 2002; Kuchman et al., 2002; Guzmán and López, 1991; Korte et al., 1996; WHO)  
 GOT: induced glutathione, ALT, aspartate aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, ALP: Alkaline phosphatase, GOT: γ-glutamyl transferase, GOT: Glutathione S-transferase in group of 1-ethoxy-2, 4-dichlorobenzene  
<sup>†</sup> Pearson chi square tests (p < 0.05)  
<sup>††</sup> Means in the same row with different letters are statistically different

CONFIDENTIAL



**Table 4. Dry matter intake (DMI), milk yield total aflatoxins (AF), concentration in total mixed ration (TMR), and linear regression parameters of transfer of aflatoxin M1 (AFM1) in milk as effect of AF in TMR**

Item	Aflatoxin group (µg/kg)					P-value	Intercept (mean ± SD)	Slope (mean ± SD)	R <sup>2</sup> (%)
	A (<5)	B (5-9.9)	C (10-19.9)	D (≥20)	SEM				
TMR samples (No.)	78	108	72	54	-	0.00 <sup>2</sup>	-	-	-
Milk samples (No.)	57	68	45	34	-	0.00 <sup>2</sup>	-	-	-
DMI (TMR kg/d)	16.3 <sup>a</sup>	16.6 <sup>a</sup>	16.6 <sup>a</sup>	16.8 <sup>a</sup>	0.08	0.60	-	-	-
AF in TMR (µg/kg)	3.5 <sup>d</sup>	7.1 <sup>c</sup>	13.5 <sup>b</sup>	50.7 <sup>a</sup>	0.41	0.00	-	-	-
AF in TMR (µg/d)	58.0 <sup>d</sup>	120 <sup>c</sup>	228 <sup>b</sup>	818 <sup>a</sup>	6.5	0.00	-	-	-
Milk (kg/cow/d)	26.9 <sup>a</sup>	26.9 <sup>a</sup>	26.9 <sup>a</sup>	26.8 <sup>a</sup>	0.01	0.90	-	-	-
AFM <sub>1</sub> in milk (ng/L)	15.6 <sup>d</sup>	34.8 <sup>c</sup>	56.9 <sup>b</sup>	80.1 <sup>a</sup>	1.1	0.00	17.2 ± 1.21	2.1 ± 0.089	58.6
AFM <sub>1</sub> in milk (ng/d)	420 <sup>d</sup>	936 <sup>c</sup>	1527 <sup>b</sup>	2146 <sup>a</sup>	31.6	0.00	462 ± 32.6	56.9 ± 2.41	58.7
AFM <sub>1</sub> transfer (%) <sup>1</sup>	0.80 <sup>a</sup>	0.74 <sup>a</sup>	0.67 <sup>b</sup>	0.36 <sup>c</sup>	0.02	0.00	0.838 ± 0.033	-0.012 ± 0.002	6.0

TMR = total mixed ration  
<sup>1</sup>AFM<sub>1</sub> transfer = excretion of AFM<sub>1</sub> (ng/d)/AF consumption (µg/d) × 100  
<sup>2</sup> Pearson chi square tests (p < 0.05)  
<sup>a-d</sup> Means in the same rows with different letters are statistically different.



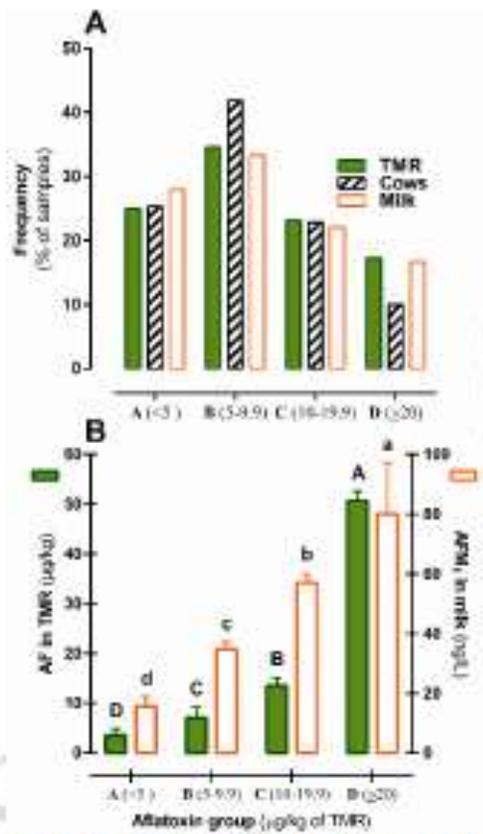


Figure 1. Occurrence of aflatoxins (AF) in raw milk and total mixed ration (TMR) of dairy cows. Panel A. Frequency of cows, TMR, and raw milk samples according to aflatoxin group. Numbers of cows, TMR and raw milk samples: N=2340 (Cow/month), 312 and 204, respectively. Panel B. Total concentration in TMR and AFM<sub>1</sub> in raw milk (mean ± SD). Means of AFM<sub>1</sub> in raw milk (\*\*\*) or AF in TMR (\*\*\*) with different letters are statistically different (Tukey HSD test, p < 0.01).

### 9.3. ANEXO 3. Técnica para cromatografía líquida de alta presión para AF en maíz

### 9.4 ANEXO 4. Técnica para ensayo inmunoenzimático para AF en alimento.

#### **Información general:**

El RIDASCREEN®FAST Aflatoxin (Art. No.: R5202) es un inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo para el análisis cuantitativo de aflatoxina en cereales y piensos, con un límite de detección de  $< 1,7 \mu\text{g/kg}$  (ppb).

#### **Fundamento:**

La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos de la microplaca están sensibilizados con anticuerpos de captura dirigidos contra anticuerpos anti-aflatoxina. Se agregan los estándares de aflatoxina o la solución de las muestras, el conjugado aflatoxina-enzima y los anticuerpos anti-aflatoxina a los pocillos. El aflatoxina libre y el conjugado aflatoxina-enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos anti-aflatoxina (inmunoensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados. Cualquier conjugado enzimático no unido se remueve en el paso de lavado. Se agrega sustrato/cromógeno a los pocillos. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno en un producto azul. La adición de la solución stop lleva a un cambio de color del azul al amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina en la muestra.

#### **Equipamiento:**

- Espectrofotómetro para placas portapocillos (450 nm).
- Probeta graduada de 100 ml de plástico o de vidrio para la preparación de las muestras: Embudo de filtrado y un vaso de precipitados de vidrio de 50 ml.
- Molino para desmenuzar las muestras.
- Agitador.
- Papel de filtro: Whatman No. 1 o equivalente.
- Micropipetas de 50  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$  y 1000  $\mu\text{l}$ .

#### **Reactivos:**

- Solución de metanol al 70 %: mezclar 70 ml de metanol (100 %) con 30 ml de agua destilada.
- Agua destilada o deionizada

#### **Muestras:**

Las muestras deben ser almacenadas en un lugar fresco, protegidas de la luz. Una muestra representativa (de acuerdo con la técnica de muestreo aceptada) debe ser molida y mezclada.

Pesar 5 g de la muestra molida en un contenedor apropiado y agréguele 25 ml de metanol al 70 %).

Agitar vigorosamente durante 3 minutos (a mano o utilizando el agitador)

Filtrar el extracto a través de un papel de filtro Whatman n. 1

Diluir 1 ml del filtrado con 1 ml de agua destilada o deionizada

Utilizar 50  $\mu$ l del filtrado diluido por pocillo en el test.

**Procedimiento:**

1. Coloque suficientes pocillos en el soporte de la microplaca para los estándares y para las muestras a analizar. Marque la posición de los estándares y de las muestras.
2. Agregue 50  $\mu$ l de los estándares y de las muestras a analizar a los pocillos correspondientes. Utilice una punta de pipeta nueva para cada estándar y para cada muestra.
3. Agregue 50  $\mu$ l del conjugado aflatoxina-enzima (tapón rojo) a los pocillos correspondientes.
4. Agregue 50  $\mu$ l del anticuerpo anti-aflatoxina (tapón negro) a los pocillos correspondientes, mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube durante 10 minutos (+/- 1) a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
5. Vacíe los pocillos y golpee luego enérgicamente (tres veces consecutivas) el marco portapocillos sobre un papel absorbente limpio para asegurar la eliminación completa de restos líquidos. Lave los pocillos (250  $\mu$ l por pocillo) con tampón de lavado (vea 10.1.) utilizando una pipeta-multicanal o una botella de lavado y vacíe nuevamente los pocillos de la forma ya indicada.
6. Repita este paso dos veces más.
7. Agregue 100  $\mu$ l de substrato/cromógeno (tapón marrón) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente e incube 5 minutos (+/- 0,5) en la oscuridad a temperatura ambiente (20 - 25 °C / 68 - 77 °F).
8. Agregue 100  $\mu$ l de la solución stop (tapón amarillo) a cada pocillo. Mezcle el contenido de la microplaca suavemente y mida la absorción a 450 nm en el transcurso de los siguientes 10 min.

## 9.5. ANEXO 5. Técnica para la medición del tiempo de tiempo de protrombina.

### **Fundamento:**

La adición de tromboplastina y calcio en muestras de plasma induce la formación del coágulo de fibrina. El método mide el tiempo que tarda en formarse el coágulo.

### **Reactivos:**

- a) Tromboplastina tisular de cerebro de conejo con estabilizantes. Liofilizado (Biosystems S. A.).
- b) Tampón con iones de calcio y sodio azida como conservante (Biosystems S. A.).

### **Muestras:**

Sangre venosa obtenida mediante venopunción. Mezclar nueve partes de sangre con una parte de trisodio citrato dihidrato 0,109 mol/L. Mezclar suavemente la sangre y centrifugar a 1500 x g durante 15 minutos para obtener el plasma.

### **Procedimiento:**

Precalentar el Reactivo de Trabajo a 37°C.

Pipetear 50 µL de muestra (plasma de paciente o control) en el tubo de ensayo..

Incubar la muestra a 37°C durante 2 minutos.

Pipetear 100 µL de Reactivo de Trabajo y simultáneamente poner el cronómetro en marcha. Determinar el tiempo de coagulación.

### **CÁLCULOS:**

El PT generalmente se expresa en segundos, anotando el tiempo en que tardó en formarse el coágulo.

**9.6. ANEXO 6. Técnica para la cuantificación de proteínas totales.**

**Fundamento:**

La proteína presente en la muestra reacciona con los iones cobre (II) en medio alcalino, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.

**Reactivos:**

- c) Acetato de cobre (II) 6 mmol/L, yoduro de potasio 12 mmol/L, hidróxido sódico 1,15 mol/L, detergente (Biosystems S. A.).
- d) Patrón de Proteína. Albúmina bovina (Biosystems S. A.).

**Muestras:**

Suero y plasma heparinizado recogido mediante procedimientos estándar.. Estable 8 días a 2-8°C.

**Procedimiento:**

1. Pipetear en tubos de ensayo de la siguiente manera:

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	20 µL		
Patrón Proteína (S)		20 µL	
Muestra			20 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

- 2. Agitar bien y dejar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 3. Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra frente al Blanco a 545 nm. El color es estable durante al menos 2 horas (espectrofotómetro; Varian DMS-80, Australia).

**CÁLCULOS:**

La concentración de proteína en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{Muestra}}{A_{Patron}} (C_{Patrón}) = C_{Muestra}$$

## 9.7. ANEXO 7. Técnica para la cuantificación de albúmina.

### Fundamento:

La albúmina presente en la muestra reacciona con el verde de bromocresol en medio ácido, originando un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.

### Reactivos:

- a) Tampón acetato 100 mmol/L, verde de bromocresol 0,27 mmol/L, detergente, pH 4,1. (Biosystems S. A.).
- b) Patrón de Proteína. Albúmina bovina (Biosystems S. A.).

### Muestras:

Suero o plasma (EDTA, heparina o citrato) recogido mediante procedimientos estándar. La albúmina en suero es estable durante 3 días a 2-8°C.

### Procedimiento:

1. Pipetear en tubos de ensayo de la siguiente manera:

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón albúmina (S)		10 µL	
Muestra			10 µL
Reactivo (A)	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL

2. Agitar bien y dejar los tubos durante 1 minuto a temperatura ambiente.
3. Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 630 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 30 minutos (espectrofotómetro; Varian DMS-80, Australia).

### CÁLCULOS:

La concentración de albúmina en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A \text{ Muestra}}{A \text{ Patron}} (C \text{ Patrón}) = C \text{ Muestra}$$

## 9.8. ANEXO 8. Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de fosfatasa alcalina.

### Fundamento:

La fosfatasa alcalina (FAL) cataliza en medio alcalino la transferencia del grupo fosfato del 4-nitrofenilfosfato al 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP), liberando 4-nitrofenol. La concentración catalítica se determina a partir de la velocidad de formación del 4-nitrofenol, medido a 405 nm.

### Reactivos:

- Reactivo: 2-Amino-2-metil-1-propanol 0,4 mol/L, sulfato de zinc 1,2 mmol/L, ácido N-hidroxietil-etilenodiaminotriacético 2,5 mmol/L, acetato de magnesio 2,5 mmol/L, pH 10,4 (Biosystems S. A.).
- Reactivo: 4-Nitrofenilfosfato 60 mmol/L (Biosystems S. A.).

### Muestras:

Suero o plasma recogido mediante procedimientos estándar. La fosfatasa alcalina en suero o plasma es estable 7 días a 2-8°C. Puede utilizarse heparina como anticoagulante.

### Procedimiento:

- Precalentar el Reactivo de Trabajo y el instrumento a la temperatura de reacción.
- Pipetear en tubos de ensayo de la siguiente manera:

	Cantidad
Reactivo de trabajo	1.0 mL
Muestra	20 µL

- Mezclar e insertar la cubeta en el fotómetro. Poner el cronómetro en marcha.
- Anotar la absorbancia inicial y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante 3 minutos.
- Calcular el incremento de absorbancia (espectrofotómetro; Varian DMS-80, Australia) por minuto promedio ( $\Delta A/\text{min}$ ).

### CÁLCULOS:

La concentración de Fosfatasa alcalina en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$(\Delta A/\text{min}) \frac{Vt \times 10^6}{(\epsilon)(l)(Vs)} = U/L$$

El coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) del 4-nitrofenol a 405 nm es 18.450, el paso de luz ( $l$ ) es 1 cm, el volumen total de reacción ( $Vt$ ) es 1,02, el volumen de muestra ( $Vs$ ) es 0,02, y 1 U/L equivale a 0,0166  $\mu\text{kat/L}$ . Se deducen los siguientes factores para calcular la concentración catalítica:  $\Delta A/\text{min}$  es 2764 = U/L

## 9.9. ANEXO 9. Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de Gamma-glutamyltranspeptidasa.

### Fundamento:

La gamma-glutamyltransferasa ( $\gamma$ -GT) cataliza la transferencia del grupo g-glutamilo de la g-glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida a la glicilglicina, liberando 3-carboxi-4-nitroanilina. La concentración catalítica se determina a partir de la velocidad de formación de la 3-carboxi-4-nitroanilina.

### Reactivos:

- c) Reactivo: Glicilglicina 206,25 mmol/L, hidróxido sódico 130 mmol/L, pH 7,9. (Biosystems S. A.).
- d) Reactivo:  $\gamma$ -Glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida 32,5 mmol/L. (Biosystems S. A.).

### Muestras:

Suero y plasma recogidos mediante procedimientos estándar. La gamma-glutamyltransferasa en suero y plasma es estable 5 días a 2-8°C. Debe utilizarse la heparina o EDTA como anticoagulante.

### Procedimiento:

1. Precalentar el Reactivo de Trabajo y el instrumento a la temperatura de reacción.
2. Pipetear en tubos de ensayo de la siguiente manera:

	Cantidad
Reactivo de trabajo	1.0 mL
Muestra	100 $\mu$ L

3. Mezclar e insertar la cubeta en el fotómetro. Poner el cronómetro en marcha.
4. Anotar la absorbancia inicial y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante 3 minutos.
5. Calcular el incremento de absorbancia (espectrofotómetro; Varian DMS-80, Australia) por minuto promedio ( $\Delta A/\text{min}$ ).

### CÁLCULOS:

La concentración de  $\gamma$ -GT en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$(\Delta A/\text{min}) \frac{Vt \times 10^6}{(\epsilon)(l)(Vs)} = U/L$$

El coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) de la 3-carboxi-4-nitroanilina es 7.908 a 410 nm y 9.900 a 405 nm, el paso de luz ( $l$ ) es 1 cm, el volumen total de reacción ( $Vt$ ) es 1,1, el volumen de muestra ( $Vs$ ) es 0,1, y 1 U/L equivale a 16,67  $\mu$ kat/L. Se deducen los siguientes factores para calcular la concentración catalítica:  $\Delta A/\text{min}$  es 1391 = U/L

## 9.10. ANEXO 10. Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de alanina aminotransferasa.

### Fundamento:

La alanina aminotransferasa (ALT o GPT) cataliza la transferencia del grupo amino de la alanina al 2-oxoglutarato, formando piruvato y glutamato. La concentración catalítica se determina, empleando la reacción acoplada del lactato deshidrogenasa (LDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm.

### Reactivos:

- e) Reactivo: Fosfato de piridoxal 10 mmol/L. 5 mL. (Biosystems S. A.).
- f) Reactivo: 4-Nitrofenilfosfato 60 mmol/L (Biosystems S. A).

### Muestras:

Suero recogido mediante procedimientos estándar. La alanina aminotransferasa en suero es estable 7 días a 2-8°C.

### Procedimiento:

1. Precalear el Reactivo de Trabajo y el instrumento a la temperatura de reacción.
2. Pipetear en tubos de ensayo de la siguiente manera:

	Temperatura de reacción 37°C
Reactivo de trabajo	1.0 mL
Muestra	50 µL

3. Mezclar e insertar la cubeta en el fotómetro. Poner el cronómetro en marcha.
4. Pasado 1 minuto, anotar la absorbancia inicial y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante 3 minutos.
5. Calcular el incremento de absorbancia por minuto promedio ( $\Delta A/\text{min}$ ).

### CÁLCULOS:

La concentración de alanina aminotransferasa en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$(\Delta A/\text{min}) \frac{Vt \times 10^6}{(\epsilon)(l)(Vs)} = U/L$$

El coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) del NADH a 340 nm es 6.300, el paso de luz ( $l$ ) es 1 cm, el volumen total de reacción ( $Vt$ ) es 1,05 a 37°C y 1,1 a 30°C, el volumen de muestra ( $Vs$ ) es 0,05 a 37°C y 0,1 a 30°C, y 1 U/L equivale a 0,0166  $\mu\text{kat/L}$ . Se deducen los siguientes factores para calcular la concentración catalítica:  $\Delta A/\text{min}$  es 3333 = U/L.

## 9.11. ANEXO 11. Técnica para la cuantificación de la actividad enzimática específica de aspartato aminotransferasa.

### Fundamento:

La aspartato aminotransferasa (AST o GOT) cataliza la transferencia del grupo amino del aspartato al 2-oxoglutarato, formando oxalacetato y glutamato. La concentración catalítica se determina, empleando la reacción acoplada del malato deshidrogenasa (MDH), a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medido a 340 nm.

### Reactivos:

- g) Reactivo: Tris 121 mmol/L, L-aspartato 362 mmol/L, malato deshidrogenasa > 460 U/L, lactato deshidrogenasa > 660 U/L, hidróxido sódico 255 mmol/L, pH 7,8 (Biosystems S. A.).
- h) Reactivo: NADH 1,3 mmol/L, 2-oxoglutarato 75 mmol/L, hidróxido sódico 148 mmol/L, sodio azida 9,5 g/L (Biosystems S. A.).

### Muestras:

Suero recogido mediante procedimientos estándar. La aspartato aminotransferasa en suero es estable 7 días a 2-8°C.

### Procedimiento:

1. Precalentar el Reactivo de Trabajo y el instrumento a la temperatura de reacción.
2. Pipetear en tubos de ensayo de la siguiente manera:

	Temperatura de reacción 37°C
Reactivo de trabajo	1.0 mL
Muestra	50 µL

3. Mezclar e insertar la cubeta en el fotómetro. Poner el cronómetro en marcha.
4. Pasado 1 minuto, anotar la absorbancia inicial y efectuar nuevas lecturas cada minuto durante 3 minutos.
5. Calcular el incremento de absorbancia (espectrofotómetro; Varian DMS-80, Australia) por minuto promedio ( $\Delta A/\text{min}$ ).

### CÁLCULOS:

La concentración de aspartato aminotransferasa en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$(\Delta A/\text{min}) \frac{Vt \times 10^6}{(\epsilon)(l)(Vs)} = U/L$$

El coeficiente de absorción molar ( $\epsilon$ ) del NADH a 340 nm es 6.300, el paso de luz ( $l$ ) es 1 cm, el volumen total de reacción ( $Vt$ ) es 1,05 a 37°C y 1,1 a 30°C, el volumen de muestra

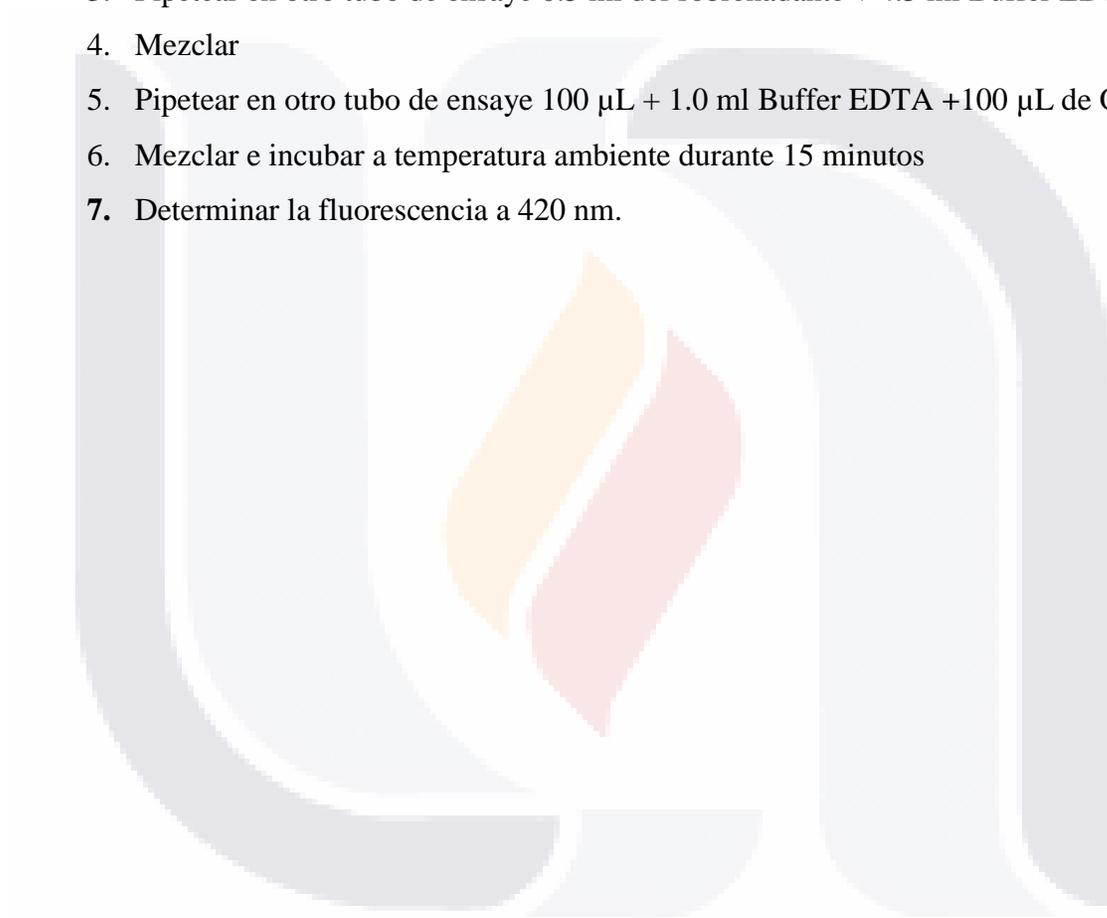
(Vs) es 0,05 a 37°C y 0,1 a 30°C, y 1 U/L equivale a 0,0166  $\mu\text{kat/L}$ . Se deducen los siguientes factores para calcular la concentración catalítica:  $\Delta A/\text{min}$  es 3333 = U/L



### 9.12 ANEXO 12. Técnica para la cuantificación de glutatión reducido.

#### Procedimiento:

1. Pipeteas en un tubo de ensaye 250  $\mu$ L de muestra + 1.0 ml 25%  $\text{HPO}_3$  + 3.7 ml Buffer EDTA.
2. Centrifugar durante 30 minutos.
3. Pipetear en otro tubo de ensaye 0.5 ml del sobrenadante + 4.5 ml Buffer EDTA.
4. Mezclar
5. Pipetear en otro tubo de ensaye 100  $\mu$ L + 1.0 ml Buffer EDTA +100  $\mu$ L de OPT
6. Mezclar e incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos
7. Determinar la fluorescencia a 420 nm.



### 9.13. ANEXO 13. Técnica para la cuantificación de transferasas de glutatión.

#### Procedimiento:

1. Pipetear en un tubo de ensaye 2.3 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  al 1.0 molar + 100  $\mu\text{L}$  de muestra.
2. Homogenizar.
3. Añadir 500  $\mu\text{L}$  GSH al 1.0 molar.
4. Añadir 100  $\mu\text{L}$  CDNB al 1.0 molar.
5. Leer en un espectrofotómetro la absorbancia de la muestra a 340 nm (Varian DMS-80, Australia).

#### 9.14. ANEXO 14. Técnica para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*.

Las muestras de suero sanguíneo se analizaron para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* mediante ELISA (inmunoanálisis enzimático) con un kit comercial (HerdCheck® IDEXX laboratorios) diluyéndose cada muestra de suero a una razón 1:100 con un diluyente para muestra (5 µL de muestra con 500 µL de diluyente). Una vez preparada la muestra el procedimiento para la detección de Anticuerpos contra *Neospora caninum* es el siguiente:

1. Verter 100 µL de control negativo sin diluir en los pozos A1 y A2.
2. Verter 100 µL de control positivo sin diluir en los pozos A3 y A4
3. Verter 100 µL de muestra diluida en cada uno de los pozos correspondientes.
4. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Aspirar el líquido de todos los pozos y desecharlo en un recipiente.
6. Lavar cada uno de los pozos 4 veces con 300 µL de solución de lavado tamponada con fosfato, aspirar el contenido entre cada lavado evitando que se sequen los pozos, después de la aspiración del lavado final golpear las placas suavemente para eliminar el líquido residual.
7. Verter 100 µL de conjugado antibovino:HRPO en cada pozo.
8. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Repetir los pasos 5 y 6.
10. Verter 100 µL de solución de substrato TMB en cada pozo de la placa.
11. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
12. Verter 100 µL de solución de interrupción en cada pozo para detener la reacción.
13. La lectura de las placas se llevará a cabo mediante un espectrofotómetro marca Cary 100 Bio&ACB UV-visible.
14. Medir y registrar la absorbancia.
15. Calcular los resultados en base a una curva de calibración y puntos de corte establecidos para la detección de animales positivos.

### 9.15. ANEXO 15. ELISA NcIgG, NcIgG<sub>1</sub> e NcIgG<sub>2</sub>.

Se procedió a la valoración de la respuesta inmune humoral en las novillas a lo largo del estudio mediante la determinación de la NcIgG, NcIgG<sub>1</sub> y NcIgG<sub>2</sub> a través mediante el uso de un ELISA *in house* indirecto con proteínas solubles de *N. caninum* como antígeno con la finalidad de mostrar el comportamiento de la enfermedad mediante el monitoreo de IgG<sub>1</sub> y IgG<sub>2</sub>, los cuales son indicativos de la presencia de una infección crónica o reciente.

#### **Procedimiento ELISA *in house* NcIgG, NcIgG<sub>1</sub> e NcIgG<sub>2</sub>:**

1. Sensibilizar la placa añadiendo 100 µl a cada pocillo de proteína Ncsp7 previamente diluida en buffer tamponado (carbonato/bicarbonato 1M) posteriormente dejar reposar toda una noche en refrigeración.
2. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
3. Bloqueo de la placa se realiza para evitar reacciones cruzadas previo a la sensibilización, mediante el uso de suero de equino inactivado (SHI), agregando 300 µl a cada pocillo de SHI posteriormente se deja reposar durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
5. Diluir las muestras de suero 1:100 (5 µl de muestra en 495 µl de diluyente PBS Tween-SHI 5%).
6. Agregar 100 µl de la muestra diluida a cada pocillo de la placa de trabajo, así como los controles positivos y negativos.
7. Incubar 1 hora a 37°C.
8. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
9. Agregar 100 µl de conjugado anti bovino a cada pocillo.
10. Incubar 1 hora a 37°C.
11. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
12. Agregar 100 µl de substrato ABTS a cada pocillo.
13. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
14. Agregar 100 µl de solución de interrupción (ácido oxálico 0.3M) a cada pocillo.
15. Leer la placa a 450 nm cada cinco minutos hasta alcanzar una lectura de absorbancia entre 0.9 y 1.

16. Medir y registrar la absorbancia.

17. Calcular el IRPC.

18. Puntos de corte establecidos para animales positivos  $>8.2$ , negativo  $<6$  y dudoso entre 6-8.2.



### 9.16. ANEXO 16. ELISA SAG<sub>4</sub>, GRA<sub>7</sub>.

Se procedió a la valoración de la respuesta inmune humoral en las novillas a lo largo del estudio mediante la determinación de NcSAG<sub>4</sub> y NcGRA<sub>7</sub> mediante el uso de un ELISA *in house* indirecto con proteínas solubles de *N. caninum* como antígeno con la finalidad de mostrar el comportamiento de la enfermedad mediante el monitoreo de NcSAG<sub>4</sub> y NcGRA<sub>7</sub>, los cuales son indicativos de la presencia de una infección crónica o reciente.

Procedimiento:

1. Sensibilizar la placa añadiendo 100 µl a cada pocillo de proteína recombinante a emplear ya sea SAG<sub>4</sub> o GRA<sub>7</sub> previamente diluida en buffer tamponado (carbonato/bicarbonato 1M) posteriormente dejar reposar toda una noche en refrigeración.
2. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
3. Bloqueo de la placa se realiza para evitar reacciones cruzadas previo a la sensibilización, mediante el uso de suero de equino inactivado (SHI), agregando 300 µl a cada pocillo de SHI posteriormente se deja reposar durante 1 hora a temperatura ambiente.
4. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
5. Diluir las muestras de suero 1:50 (1 µl de muestra en 50 µl de diluyente PBS Tween-SHI 5%) diluir de igual manera los sueros controles positivos y negativos.
6. Agregar 100 µl de la muestra diluida a cada pocillo de la placa de trabajo, así como los controles positivos y negativos.
7. Incubar 1 hora a 37°C.
8. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
9. Agregar 50 µl de conjugado anti bovino SAG<sub>4</sub> o GRA<sub>7</sub> a cada pozo según corresponda.
10. Incubar 1 hora a 37°C.
11. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
12. Agregar 50 µl de substrato ABTS a cada pozo.
13. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
14. Agregar 50 µl de solución de interrupción (ácido oxálico 0.3M) a cada pozo
15. Leer la placa a 450 nm cada cinco minutos hasta alcanzar una lectura de absorbancia entre 0.9 y 1.

16. Medir y registrar la absorbancia.
17. Calcular el IRPC.
18. Los puntos de corte establecidos para NcGRA<sub>7</sub> son positivos >18, negativo <9, sospechoso entre 9-18 y para NcSAG<sub>4</sub> son positivos >14, negativo <6, sospechoso entre 6-14.



### 9.17. ANEXO 17. ELISA de avidéz.

Se procedió a la valoración de la respuesta inmune humoral en las novillas a lo largo del estudio mediante la determinación de avidéz mediante el uso de un ELISA *in house* indirecto con proteínas solubles de *N. caninum* como antígeno con la finalidad de mostrar el comportamiento de la enfermedad mediante el monitoreo de IgG<sub>1</sub> y IgG<sub>2</sub>, los cuales son indicativos de la presencia de una infección crónica o reciente.

#### **Procedimiento:**

1. Sensibilizar la placa añadiendo 100 µl a cada pocillo de proteína Ncsp7 previamente diluida en buffer tamponado (carbonato/bicarbonato 1M) posteriormente dejar reposar toda una noche en refrigeración.
2. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
3. Bloqueo de la placa se realiza para evitar reacciones cruzadas previo a la sensibilización, mediante el uso de suero de equino inactivado (SHI), agregando 300 µl a cada pocillo de SHI posteriormente se deja reposar durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
5. Diluir las muestras de suero a una razón de 1:25, 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400, 1:25600 por pocillo con el diluyente PBS Tween-SHI 5%.
6. Agregar 100 µl de la muestra diluida a cada pocillo de la placa de trabajo, así como los controles positivos y negativos y los controles de alta y baja avidéz.
7. Incubar 1 hora a 37°C.
8. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
9. Agregar 100 µl de urea 6M en uno de los pocillos de duplicado de cada suero mientras que para el duplicado se le coloca solo PBS Tween.
10. Incubar 10 minutos a 37°C.
11. Agregar 100 µl de conjugado anti bovino a cada pocillo.
12. Incubar 1 hora a 37°C.
13. Realizar 3 lavados a la placa con PBS Tween 5%.
14. Agregar 100 µl de substrato ABTS a cada pocillo.
15. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

16. Agregar 100  $\mu$ l de solución de interrupción (ácido oxálico 0.3M) a cada pocillo.
17. Leer la placa a 450 nm cada cinco minutos hasta alcanzar una lectura de absorbancia entre 0.9 y 1.
18. Medir y registrar la absorbancia.
19. Calcular el IRPC y realizar curvas patrón para determinar avidéz.
20. Cálculo para la avidéz baja avidéz <25, intermedia avidéz 26-39 y alta avidéz >4.



### 9.18. ANEXO 18. Técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

El fundamento de la técnica se basa en el uso e inmunomarcadores (anticuerpos) unidos a una sustancia fluorescente para la detección de antígenos específicos. El estudio de la respuesta humoral en suero precalostrado de los terneros se realizó mediante la detección de IgG específicas frente al parásito y como antígeno se utilizó taquizoítos de *N. caninum* obtenidos en cultivo celular y fijados con formol tamponado a pH=7

#### Material:

- Laminillas antigenadas con *Neospora caninum*.
- Conjugado anti-bovino diluido previamente en azul de Evans al 0.2%.
- Control positivo a *Neospora caninum*.
- Control negativo a *Neospora caninum*.
- Diluyente para las muestras (PBS 1X).
- Solución de lavado (PBS 1X).

#### Preparación de las muestras:

#### Procedimiento:

1. Colocar 9 µl de la muestra diluida en la laminilla.
2. Incubar las laminillas durante 30 minutos a 37 °C.
3. Realizar dos lavados de diez minutos cada uno con PBS 1X.
4. Secar las laminillas a temperatura ambiente.
5. Colocar 9 µl de conjugado anti-bovino.
6. Incubar las laminillas durante 30 minutos a 37 °C.
7. Realizar tres lavados de diez minutos cada uno con PBS 1X y realizar el último lavado con agua destilada.
8. Secar las laminillas a temperatura ambiente, evitando la presencia de luz directa.
9. Montar las laminillas.
10. Observar en el microscopio de fluorescencia.

11. Registrar los resultados.



### 9.19. ANEXO 19. Pruebas diagnósticas en fetos abortados histopatología.

Las muestras de tejido colectadas y conservadas en formalina neutra bufferada al 10% para su preservación, se procesaron mediante histopatología para la observación microscópica de lesiones sugestivas con la presencia de *Neospora caninum* o lesiones sugestivas de aflatoxicosis en los tejidos, mediante la observación con la tinción de Hematoxilina eosina siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Conservar las muestras de tejido en formalina neutra bufferada al 10%.
2. Lavar las muestras en agua destilada.
3. Realizar cortes de tejido con un tamaño aproximado de 1 a 1.5 cm<sup>3</sup>.
4. Deshidratar el tejido mediante seis pases continuos en etanol a diferentes gradientes de concentración (uno al 80%, tres al 96%, dos al 100%) con inmersiones de 1 hora por pase.
5. Aclarar el tejido sumergiendo las muestras en xilol puro en dos tiempos de una hora cada uno.
6. Inclusión en parafina.
7. Infiltración rápida en parafina líquida por 15 minutos a 52° C (Histoquinet, Leica TP 1020).
8. Elaboración de bloques de parafina mediante el embebido de las muestras (Leica EG 1150 H) y su posterior enfriado (Leica EG 1150 C).
9. Realizar cortes histológicos en el micrótopo (Leica RM 2125 RT).
10. Tinción y montaje del tejido.
11. Visualización al microscopio 100x (Leica DM LS2).

## 9.20. ANEXO 20. Pruebas diagnósticas en fetos abortados PCR.

Las muestras de tejidos colectadas de los fetos abortados fueron analizadas mediante la técnica de PCR anidada descrita por Ellis et al. (1999) y con modificaciones establecidas por Medina-Esparza, et al. (2006), utilizando primers NF1, NS2, NR1 y SR1; con la siguiente metodología:

1. Las muestras destinadas para su amplificación de ADN, fueron fijadas con formol, embebidas en parafina y se elaboraron cortes histológicos del tejido (5  $\mu$ m).
2. Las muestras fueron resuspendidas en 100 ml de agua destilada estéril, superpuestas con 50  $\mu$ l de aceite mineral y calentados en un termociclador durante 15 minutos a 99.9 ° C.
3. El tubo se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta que se obtuvieron las muestras para PCR.
4. Las concentraciones de ADN en cada muestra fueron verificadas mediante espectrofotometría, utilizando 5  $\mu$ l de la muestra que contenía 2 ng de ADN para PCR.
5. Las muestras fijadas en formalina e incorporadas en parafina de tejidos cerebrales de fetos bovinos abortados con neosporosis congénita (confirmada por HP y IHC) fueron utilizadas como un control positivo; Mientras que secciones cerebro de una vaca, sin signos clínicos y negativos a neosporosis (confirmada por HP e IHC), se usaron como control negativo.
6. Los productos de amplificación por PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con un marcador de tamaño estándar (Phix 174 DNA, Gibco, BRL).
7. Un resultado positivo fue registrado si se detectó un producto de 146 bp por lo menos en una de las tres o cinco secciones.