

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“SEROPREVALENCIA DE *Neospora caninum* EN VACUNOS
BROWN SWISS EN EL DISTRITO DE CARACOTO - PUNO”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. DARWIN YOEL BANEGAS MANGO

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PUNO – PERÚ

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

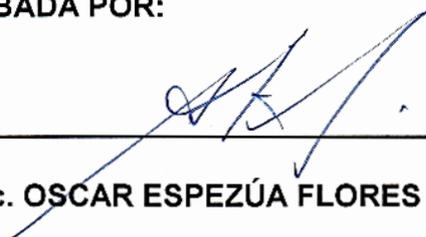
TESIS

“SEROPREVALENCIA DE *Neospora caninum* EN VACUNOS BROWN SWISS EN EL DISTRITO DE CARACOTO - PUNO”

PRESENTADA POR:
Bach. DARWIN YOEL BANEGAS MANGO
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA
APROBADA POR:



PRESIDENTE:


MSc. OSCAR ESPEZÚA FLORES

PRIMER MIEMBRO:


MSc. OSCAR DAVID OROS BUTRON

SEGUNDO MIEMBRO:


Mg. ELOY AMADOR CONDORI CHUCHI

DIRECTOR:


D.Sc. NATALIO LUQUE MAMANI

ASESOR:


Mg. Sc. NUBIA CATACORA FLORES

Área : Salud animal

Tema : Seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos Brown swiss

Fecha de Sustentación: 26 de diciembre de 2018

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN.....	11
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	13
	2.1 Historia de Neosporosis.....	13
	2.2 Generalidades	13
	a. Etiología de la Neosporosis.....	13
	b. Taxonomía	14
	c. Estadios de Neospora caninum.....	14
	d. Ciclo Biológico.....	16
	e. Epidemiología.....	17
	f. Factores predisponentes.....	20
	2.3 Patogénesis.....	24
	2.4 Signos clínicos.....	27
	2.5 Lesiones	28
	2.6 Inmunidad.....	29
	2.7 Diagnóstico.....	31
	2.8 Tipos de Diagnostico	32
	2.9 Diagnostico no serológico.....	36
	2.10 Tratamiento.....	37
	2.11 Control y Prevención.....	38
	2.12 Antecedentes.....	40
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
	3.1 Lugar de estudio	43
	3.2 Material de estudio.....	43
	3.3. Toma de Muestra de Suero Sanguíneo	44
	3.4 Muestra.....	44
	3.5. Materiales para la toma de muestras sanguíneas.....	44
	3.6. Materiales para la prueba de ELISA.	45
	3.7. Reactivos.....	45
	3.8. Equipos de Laboratorio.....	46
	3.9. Metodología.....	46
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	50
	4.1 Seroprevalencia general de <i>Neospora caninum</i>	50
	4.2. Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en vacunos según sexo	51
	4.3. Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en vacunos según edad.....	52

4.4. Seroprevalencia de Neospora caninum según estado reproductivo	53
V. CONCLUSIONES.....	56
VI. RECOMENDACIONES	57
VII. BIBLIOGRAFIA	58
ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia de <i>Neospora caninum</i> en vacunos menores de los dos años del Distrito Caracoto – San Román – Puno, según sexo.....	51
Tabla 2. Prevalencia de <i>Neospora caninum</i> en vacunos del distrito Caracoto – San Román – Puno, según edad.....	52
Tabla 3. Prevalencia de en vacas según estado reproductivo del distrito de Caracoto – San Román - Puno, según estado reproductivo.....	53

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

FMVZ = Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

C/P = Con producción

S/P = Sin Producción

ELISA = Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

UNA = Universidad Nacional del Altiplano

T.M. = Toneladas métricas

RIA = Radio inmunoensayo

rpm = Revoluciones por minuto

nm = Nanómetros

Ig G = Inmunoglobulinas G

Ig M = Inmunoglobulinas M

IL = Interleucina

μ L = Microlitros

mL = Mililitros

ADN = Ácido desoxirribonucleico

DEDICATORIA

*A Dios, por haberme permitido
cumplir con mi sueño de ser
profesional y haberme dado salud y
fuerzas para poder seguir adelante
cada día.*

*A mis padres, hermanos y toda mi
familia por darme su apoyo, por la
constante motivación que hizo
posible este logro personal.*

AGRADECIMIENTO

A mi la facultada por haberme formado como profesional y a cada uno de las personas que lo componen pues en estas aulas pase las experiencias mas bonitas de mi vida en donde pude aprender lo valiosa y hermosa que es la carrera.

RESUMEN

El trabajo de investigación fue realizado en vacunos Brown Swiss del distrito de Caracoto provincia de San Roman – Región Puno; con el objetivo de evaluar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos según sexo, edad (menores a 2 años y mayores a 2 años), en estado reproductivo (preñadas y vacias), en un sistema de crianza extensivo. El tamaño de muestra fue de 85 vacunos, de los cuales se obtuvieron muestras de 6 ml de sangre de la vena yugular, el método de diagnóstico fue ELISA, el cual se desarrolló en el laboratorio de Salud animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNA con sede en C.I.P Chuquibambilla. El resultado de La seroprevalencia general de *Neospora caninum* fue de 4.71 %. La seroprevalencia de la *Neospora caninum* en vacunos machos fue 9,09% y hembras 4.05 % ($P>0.05$). La prevalencia de la *Neospora caninum* en animales menores a dos años fue 7.14% y en mayores de 2 años 3.51% ($P>0.05$). Las vacas preñadas en producción mostraron 15.38 % de prevalencia y las vacas preñadas en seca ninguna ($P>0.05$).

La seroprevalencia de *Neospora caninum* es independiete pues este protozoo afecta a machos y hembras, sin importar la edad, el estado reproductivo y ni la etapa de producción.

Palabras Clave: Neosporosis, Seroprevalencia, ELISA, Vacunos

ABSTRACT

The research work was carried out in Brown Swiss cattle from the district of Caracoto province of San Roman - Puno Region; with the objective to evaluate the seroprevalence of *Neospora caninum* in cattle according to sex, age (less than 2 years and older than 2 years), reproductive status (pregnant and void), in an extensive breeding system. The sample size was 85 cattle, from which samples of 6 ml of blood from the jugular vein were obtained, the diagnostic method was ELISA, which was developed in the animal health laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the UNA with headquarters in CIP Chuquibambilla. The result of the general seroprevalence of *Neospora caninum* was 4.71% of a population of 85 animals. The seroprevalence of *Neospora caninum* in male cattle was 9.09% and females 4.05% ($P > 0.05$). The prevalence of *Neospora caninum* in animals younger than two years was 7.14% and in older than 2 years 3.51% ($P > 0.05$). The pregnant cows in production showed 15.38% of prevalence and the cows pregnant in dry none ($P > 0.05$). In conclusion, the permanent surveillance program should be implemented in the cattle population of the district.

The seroprevalence of *Neospora caninum* is independent because this protozoan affects males and females, regardless of age, reproductive status or stage of production.

Keywords: *Neospora*, Seroprevalence, ELISA, Cattle

I. INTRODUCCIÓN

La actividad pecuaria en el Perú es una de las principales actividades que realizan las familias rurales, a nivel nacional la población bovina es de 5 535 332 cabezas y en la región de Puno la población bovina es de 726 080 cabezas y en la provincia de San Román es de 33 530 cabezas. (Dirección Regional Agraria Puno, 2016)

La neosporosis, enfermedad producida por *Neospora caninum*, es causante de aborto en vacas de todos los continentes (Anderson *et al.*, 2000; Dubey, 2003) y por lo tanto genera pérdidas económicas directas, como también costos indirectos asociados a la asesoría veterinaria para establecer un diagnóstico, la repetición de la inseminación o cruce, aumento del tiempo de lactancia, pérdidas de producción láctea y los costos de reemplazo en los casos de eliminación de las vacas (Barr *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 2002).

Una característica importante de esta enfermedad en el vacuno es que el parásito puede permanecer latente como una infección crónica, de allí que la transmisión vertical o transplacentaria sea un elemento crucial en el establecimiento y la diseminación de la infección. Si la infección del feto no resulta en aborto, la cría resultante puede convertirse en portador clínicamente sano (asintomático) pero que podrá transmitir la infección a las siguientes generaciones (Anderson *et al.*, 2000).

Estudios recientes indican que el *Neospora caninum* se viene convirtiendo en un agente parasitario de gran importancia en el Perú, según los estudios de prevalencia realizados en las diversas cuencas lecheras (Rivera, 2001).

Este estudio se realizó con la finalidad de determinar la presencia de este agente patógeno por el crecimiento poblacional urbano de Caracoto y la cercanía hacia la ciudad de Juliaca.

1.1.1 Objetivo General

Determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos Brown Swiss del Distrito de Caracoto.

1.1.2 Objetivo Específico

- Determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos según sexo (machos y hembras) menores a 2 años.
- Determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* según la edad.
- Determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* según estado reproductivo: vacías y preñadas (con producción y sin producción).

I. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Historia de Neosporosis

Esta enfermedad esta difundida por los cinco continentes. Es ocasionada por un protozoo denominado *Neospora caninum* y es una afección que causa importantes pérdidas económicas en explotaciones lecheras y de carne. (Iván Perera, 2015)

El agente causal es de la Neosporosis bovina, es un parasito intracelular descrito por primera vez en los cachorros de un perro que presentaron parálisis y muerte temprana en Noruega (Bjerkås *et al.*, 1984). Se denominó Neospora por ser un nuevo género de coccidia identificado y *caninum* por ser el perro el primer hospedador del cual se caracterizó y se aisló. (Dubey *et al.*, 1988).

Con respecto al ganado bovino el parasito se identificó por primera vez en el ganado lechero con problemas de aborto en EE. UU (Thilsted y Dubey *et al.*, 1989), en 1989 se identificó el feto abortado de un bovino y el 1993 se lo aísla en cultivos en vitro. (Echaide I. 2000)

2.2 Generalidades

a) Etiología de la Neosporosis

La Neosporosis bovina es producida por un protozoo formador de quistes perteneciente a la familia Sarcocystidae, Género Neospora. Solo una especie ha sido citada, *Neospora caninum* por Dubey en 1998, como agente productor de una encefalomiелitis congénita y ataxia locomotora en los cachorros (Campillo C., *et al* 1999), también afecta a las principales especies de ganado doméstico, animales de compañía y a algunos animales salvajes (Radostis, 2002).

b) Taxonomía

Neospora caninum pertenece al:

Reino	Protista
Subreino	Protozoo
Phylum	Apicomplexa
Clase	Esporozoa
Orden	Eucoccidia
Suborden	Eimeriina
Familia	Sarcocystidae
Genero	<i>Neospora</i>
Especie	<i>Neospora caninum</i>

Fuente. Vignau, *et al*, 2005.

c) Estadios de *Neospora caninum*

1. Taquizoitos.

Es uno de los tres estados infecciosos de *Neospora caninum* y se encuentra en el hospedador intermedio y en forma intracelular, generalmente a nivel citoplasmático específicamente en la vacuola parasitófaga de la célula hospedador; puede parasitar a un gran número de células como neuronas, macrófagos, fibroblasto, células endoteliales, miocitos, hepatocitos. Los taquizoitos se dividen por endodiogénesis en forma rápida, miden aproximadamente 7,5 μm aprox. (3- 7 μm) de longitud, (1- 5 μm) de ancho, tiene entre 6-16 roptries y en algunos casos presentaron entre 4-6 roptries localizados posterior al núcleo, raramente se observa un microporo. Son de forma ovoide, semilunar o globosa. (Andresen, 1999).

2. Bradizoitos

Los bradizoitos se dividen por endodiogénesis, en forma lenta, encontrándose dentro de los quistes tisulares, miden aproximadamente 7-8 μm presentan, un número menor de roptries, morfológicamente son similares a los taquizoitos, los quistes tisulares han sido observados en tejido nervioso y muscular (Anderson *et al.*, 2000).

3. Quistes

Es un estado en el hospedador intermediario; los quistes en el tejido son ovalados o redondos y miden hasta 107 μm de diámetro y se encuentran primariamente en el sistema nervioso central, dentro de los quistes se encuentran los bradizoitos aproximadamente entre 50 a 500, su pared es lisa y gruesa (Moore *et al.*, 2005).

4. Ooquistes no esporulados

Son los eliminados por los perros infectados experimentalmente, midiendo entre 11.7 a 11.3 mm de diámetro (Lindsay y col 1999)

5. Ooquistes esporulados

Los ooquistes no esporulados luego de tres días en el medio ambiente desarrollan dos esporo-quistes con cuatro esporozoitos cada uno morfológicamente similar a los ooquistes de *T. gondii* y *Hammondia* en perro, los estados enteroepiteliales en el perro no han sido descritos hasta el presente. (Paz, 2005).

Tabla 1. Estadios de *Neospora caninum*

Estadio	Ubicación
Taquizoito	Huésped intermedio
Bradizoito	Huésped intermedio (quistes tisulares)
Esporozoito	Huésped definitivo, eliminado por las heces

Fuente: Escalona *et al.*, 2010

d) Ciclo Biológico

Neospora caninum comprende un ciclo biológico indirecto, es decir requiere de hospedadores intermediarios y definitivos que favorecen su diseminación (Martínez *et al.*, 2012). Hasta la fecha se han descrito como hospedadores definitivos, el perro (McAllister *et al.*, 1998), el coyote (Gondim *et al.*, 2004b), el dingo (King *et al.*, 2010) y el lobo (Dubey, 2011).

Se ha definido a diferentes animales domésticos como hospedadores intermediarios entre ellos los caninos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y animales silvestres como lobos, coyotes, zorros, ciervos y alces (Montiel *et al.*, 2011).

El perro actúa como hospedador intermediario y hospedador definitivo, desarrollando las fases de reproducción asexual (merogonia) y sexual (gametogonia), respectivamente; luego de ingerir los quistes tisulares con bradizoitos (infección transversal). Consecuentemente en las heces los perros excretan los ooquistes inmaduros, que luego de unos pocos días esporulan y entonces están listos para infectar al bovino y a otros animales. En el bovino ocurre una reproducción asexual (merogonia), asintomática, pero con capacidad de infección vertical o transplacentaria, para generar patología fetal y aborto. En

estos tejidos hay taquizoitos y bradizoitos, que al ser ingeridos por el perro complementan el ciclo (Cordero; 1999).

Los huéspedes intermediarios, por ejemplo, los bovinos, ingieren los ooquistes con agua o alimento contaminados, los mismos se abren en el intestino, y penetrando las células se transforman en taquizoitos que se dividen rápidamente y se distribuyen por todo el organismo. Estos proliferan en diversas células, las destruyen, se liberan e infectan otras células vecinas. También son capaces de cruzar la placenta e infectar el feto. Cuando el huésped desarrolla una respuesta inmunitaria suficiente, se forman los quistes tisulares en el sistema nervioso (Fisher y McGarry, 2007)

En humanos no existen antecedentes de infección con este parásito (Petersen et al., 1999; Tranas *et al.*, 1999). Sin embargo, existe la posibilidad que sea subdiagnosticado como toxoplasmosis (Bjerkås *et al.*, 1994; Tranas *et al.*, 1999). Se considera que tiene un potencial zoonótico debido a que experimentalmente se ha logrado infectar a 2 monos Rhesus, pero, aún no existe evidencia de infección en humanos (Dubey, 2003).

e) Epidemiología

1) Parasito

Neospora caninum se describió por primera vez en el año 1984 por Bjerkås y colaboradores en Noruega, cuando un protozoo formador de quistes, similar a *Toxoplasma gondii*, fue observado en perros que presentaban trastornos nerviosos graves caracterizados por meningoencefalomielitis y miositis (Bjerkås *et al.*, 1984).

A comienzos de la década de los 90, Anderson (1991) y Barr (1991) reconocieron a la neosporosis como la principal causa de aborto en el ganado bovino lechero de California, hecho que fue apoyado por los resultados obtenidos por diferentes grupos investigadores de otros países. Desde entonces, se han multiplicado los estudios para la obtención y caracterización de diversos aislados de *Neospora caninum*, no solo de origen canino sino también bovino (Conrad; 1993 y Barr BC; 1994).

2) Hospedador definitivo

El descubrimiento del perro como un hospedador definitivo para *Neospora caninum* puso de manifiesto la posible transmisión horizontal de la infección, ya que se detectó la eliminación de ooquistes en las heces del perro (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999).

Los hospederos definitivos adquieren la infección al ingerir tejidos conteniendo quistes (Del Campo *et al.*, 2003). En el hospedador definitivo, los jugos gástricos se encargan de degradar el quiste liberando así los estadios parasitarios que iniciarán el ciclo entero epitelial, allí en el intestino, se realiza una fase de reproducción sexual (gametogonia) para eliminar los ooquistes no esporulados al medio ambiente 8 o 14 días post infección en las heces del hospedador definitivo (Moore *et al.*, 2005).

Los perros que consumen tejidos infectados pueden eliminar quistes manteniendo su condición de seronegativo; un canino que se comporta como hospedador intermediario puede ser seropositivo y transmitir la infección vertical a sus cachorros o presentar miositis, parálisis y dermatitis. La exposición

postnatal de los caninos está demostrada por el incremento de la seroprevalencia en perros de mayor edad (Moore *et al.*, 2005).

La infección en los canes ha sido reportada en varios países, aunque los casos de enfermedad clínica son escasos. Estudios epidemiológicos demuestran que los perros presentan prevalencias variadas, sin embargo, los perros de zonas urbanas presentan una tasa de infección menor que aquellos que viven en establos; y además dicha infección aumenta cuando los animales proceden de establos con problemas de abortos (Basso *et al.*, 1999). Todavía se encuentra en debate si los zorros y más aún los lobos que tienen una relación filogenética cercana con los perros puedan también ser hospedadores definitivos de *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 2007)

3) Hospedador intermediario

Se describen diversos hospederos intermediarios, tanto animales domésticos (caninos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y equinos) como silvestres (lobos, coyotes, zorros, ciervos y alces) (Moore *et al.*, 2002).

El primer reporte de *Neospora caninum* en bovinos, lo realizaron Thilsted y Dubey en 1989, en cerebro de fetos de bovinos abortados, de vacas de nuevo México. Sin embargo, el diagnóstico fue confirmado por Lindsay y Dubey en 1989 quienes identificaron al parásito en tejido bovino. (Oviedo., *et al*, 2006)

Adicionalmente, existen diferentes estudios en los cuales se ha encontrado serología positiva a *Neospora* en animales salvajes, incluyendo el zorro rojo y gris, el zorro de Chiloé y el león, como también en animales marinos (Buxton *et al.*, 2002; Dubey, 2003).

En el hospedador intermediario, se lleva a cabo la reproducción asexual (merogonia), posteriormente de que estos animales consumen agua o alimentos contaminados con ooquistes esporulados provenientes de materia fecal de hospedadores definitivos (perros principalmente). Por lo anterior, se puede indicar que la mayoría de las infecciones se llevan a cabo en épocas de lluvia, ya que la viabilidad de los ooquistes disminuye en época seca, se debe tener presente que sólo son necesarios 300 ooquistes esporulados para infectar una ternera (Gondim *et al.*, 2004).

Los hospedadores susceptibles se infectan ingiriendo forraje y agua contaminada con heces que contienen ooquistes de *N. caninum*. Seguidamente a la ingestión los esporozoitos son liberados en el tracto intestinal. Estos se dividen rápidamente, causando daño tisular y diseminando la infección a otros tejidos del hospedador (Dubey and Lindsay, 1996).

También este protozoo puede ser eliminado a través del semen en toros y su ADN ha sido ocasionalmente detectado en muestras de semen congelado. Aunque los toros se comportan como hospedadores intermediarios sería poco probable la ocurrencia de transmisión venérea; sin embargo, esta posibilidad aún no ha sido investigada (Moore., *et al*, 2005).

f) Factores predisponentes

1) Edad

Existen trabajos donde se ha demostrado que en rodeos endémicamente infectados con *N. caninum*, los valores de seroprevalencia no difieren en cuanto a la edad de los animales (Paré *et al.*, 1996). Sin embargo, también existen trabajos realizados sobre rodeos bovinos infectados endémicamente, donde se

ha observado un patrón en el título de anticuerpos en relación a la edad, existiendo valores significativamente más elevados en terneros precalostrados y calostrales comparados con el título promedio de grupos de otras edades. (Anderson *et al.*, 1995; Davison *et al.*, 1999; Pereira-Bueno *et al.*, 2000).

Las diferencias encontradas en relación con el riesgo de aborto de los animales y la edad han sido poco sólidas o no son significativas, señalando que la infección se ha diagnosticado en fetos abortados por vacas de edad muy variable (Dubey; Lindsay, 1996).

2) Sistema de Producción

El sistema de manejo en las explotaciones de leche normalmente es intensivo, mientras que en las de carne es más frecuente extensivo, por tanto, el hacinamiento de los animales podría contribuir a una mayor exposición a posibles fuentes de contaminación de ooquistes (alimento, cama, agua, etc.) facilitando las posibilidades de contagio (Dijkstra *et al.*, 2002).

Se han descrito abortos por *Neospora* tanto en vacas de aptitud cárnica como lechera, aunque se dispone de más datos sobre vacuno de leche; no se cree que exista predisposición racial, sino que la mayor tasa de abortos en ganado lechero estaría relacionada con el manejo, la mayor densidad de animales en explotaciones intensivas y la mayor facilidad de que los alimentos se contaminen con heces del hospedador definitivo. Asimismo, es más fácil que los abortos pasen desapercibidos en ganaderías extensivas (Cebrián, 2003).

3) Presencia de hospedadores definitivos e intermediarios

Los estudios epidemiológicos indican que la presencia de perros en los hatos es un factor de riesgo para la ocurrencia de abortos por *Neospora caninum*

en vacas y el riesgo aumenta cuando existen de tres a más perros (Puray *et al.*, 2006)

Se cree que en las grandes explotaciones existe un menor control sobre el consumo, por parte de los perros, de placentas, fetos abortados y otras fuentes de infección, interviniendo en la diseminación horizontal de la enfermedad (Bartels *et al.*, 1999; Otranto *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2007).

A su vez, se han encontrado seroprevalencias mayores en aquellas explotaciones bovinas más próximas a zonas urbanizadas, lo cual es explicable por una mayor densidad de la población canina (Schaes *et al.*, 2003). En otros estudios de seroprevalencia para *Neospora caninum*, muestran una seropositividad más alta en perros de áreas periurbanas que en perros de áreas urbanas (Fernández, 2004).

4) Adquisición de animales

En los rodeos seronegativos existe un mayor riesgo de infección cuando se utilizan para reposición vaquillonas de compra (Schaes *et al.*, 2004). Mientras que, si la enfermedad es endémica en un establecimiento, la reposición con vientres propios conlleva al mantenimiento de la infección (Barling *et al.*, 2001; Otranto *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2007).

En un estudio realizado en Alemania, grandes rebaños tenían un mayor riesgo, siendo los de leche de mayor positividad. Las explicaciones posibles son que al aumentar el tamaño del hato hay una mayor probabilidad de adquirir *Neospora caninum*, por ejemplo, al comprar vaquillas de reposición (Dubey *et al.*, 2007)

5) Alimentación

Las diferentes prácticas de manejo nutricional, como el traslado del ganado fuera del establecimiento, de forma permanente o temporaria, en busca de recursos forrajeros, fue asociado con incremento en la seroprevalencia. Por otro lado, el uso de suplementos nutricionales o cercos podría incrementar la población de hospedadores intermediarios, como roedores, constituyendo una posible fuente de infección para los hospedadores definitivos (Dubey *et al.*, 2007). Pastos, forrajes y agua de bebida contaminados con ooquistes son considerados como potenciales fuentes de infección postnatal del ganado. Alimentación de vaquillas con forrajes de baja calidad o forrajes remanentes durante el verano, pueden ser un factor de riesgo para la presentación de *Neospora caninum* asociados a abortos en los países bajos. (Dubey *et al.*, 2007)

6) Clima

Las condiciones climáticas tienen efecto sobre la esporulación de los ooquistes y sobrevivencia del parásito en el medio ambiente. Temperaturas cálidas y alta humedad incrementan el riesgo de infección posnatal (Bartels *et al.*, 1999). A su vez estas condiciones hacen propenso al crecimiento de hongos y producción de micotoxinas que tras su consumo tienen un efecto inmunosupresor sobre los bovinos, posiblemente favoreciendo la reactivación del parásito (Bartels *et al.*, 1999).

Se puede indicar que la mayoría de las infecciones se llevan a cabo en épocas de lluvia, ya que la viabilidad de los ooquistes disminuye en época seca, se debe tener presente que sólo son necesarios 300 ooquistes esporulados para infectar una ternera (Gondim, *et al.*, 2004).

7) Raza

Las diferencias de prevalencia entre razas en estudios realizados en Europa, no sería por variaciones en susceptibilidad, sino por los diferentes sistemas de producción e intensidad en los manejos a los que están sujetos cada una (Bartels *et al.*, 2006).

8) Presencia de infección

Debemos considerar la existencia de infecciones concurrentes por otros patógenos, agentes inmunosupresores infecciones y no infecciosos que pueden predisponer al aborto de fetos infectados por *Neospora caninum* (Barr *et al.*, 1991)

Algunos autores sugieren que la infección por el virus de la diarrea viral bovina (DVB) favorece la manifestación clínica de la neosporosis bovina por la inmunosupresión que ocasiona en el animal facilitando la reactivación de las infecciones latentes o la infección postnatal (Dubey *et al.*, 2007). En estos casos las infecciones por *Neospora caninum* afectan significativamente el riesgo de aborto en los hatos con presencia de DVD (Bjorkman *et al.*, 2000).

2.3 Patogénesis

a) Transmisión en perros

Los caninos que consumen los tejidos infectados eliminan ooquistes manteniendo así su condición de seronegativos, por otro lado, cuando el perro actúa como hospedador intermediario puede ser seropositivo y transmitir de esta forma la infección verticalmente a sus cachorros, también puede desarrollar la enfermedad presentando signos clínicos como parálisis, miositis y dermatitis (Moore *et al.*, 2005).

b) Transmisión en bovinos

La transmisión de la infección se realiza mediante dos formas: vertical (congénita o endógena) y horizontal (exógena). En la vertical, la madre infecta el feto a través de la placenta, se presenta en el hospedador intermediario ya sea carnívoro o herbívoro y frecuentemente se describe en los bovinos y en el perro. En la horizontal, el hospedador intermediario debe consumir alimento o agua contaminados con ooquistes esporulados provenientes de heces del hospedador definitivo (Santana *et al.*, 2010).

c) Transmisión vertical

La transmisión vertical vía transplacentaria se produce tanto en animales en los que no se observa patología abortiva como en aquellos que han abortado (Dubey & Lindsay, 1996). La infección vertical ocurre en hembras preñadas, generalmente con infección subclínica, en las cuales se produciría la infección de los fetos como consecuencia de una parasitemia durante la preñez. (Trees; 1999).

La transmisión vertical es la forma más frecuente de infección en los bovinos a nivel mundial, en diversas investigaciones se ha demostrado que la transmisión transplacentaria es la ruta más dominante de infección, ya que un 75-95% de terneras nacidas de vacas infectadas, nacen infectadas. (Jiménez & Zambrano, 2012), (Špilovská *et al.*, 2015).

La transmisión de madre a hija fue sugerida como la principal vía por varios autores. (Shares *et al.*, 1998) demostraron que *Neospora caninum* puede ser mantenida por varias generaciones a un nivel constante de prevalencia, aparentemente sin la necesidad de dispersión de un hospedador definitivo,

corroborando la teoría de que la ruta transplacentaria es la más importante en la especie bovina. (Shares *et, al.* 1998).

Desde el punto de vista del origen de la infección transplacentaria, se han descrito dos modos de transmisión, la exógena y la endógena (Trees & Williams, 2005). Ambos modos presentan consecuencias patogénicas y epidemiológicas diferentes, por lo que sus medidas de control también lo son. La transmisión transplacentaria endógena ocurre tras la recrudescencia de una infección crónica durante la gestación en una hembra persistentemente infectada. En cambio, la transmisión transplacentaria exógena se presenta en vacas que adquieren la infección por primera vez por el consumo de ooquistes esporulados durante la gestación, transmitiendo la infección a su descendencia. Las granjas infectadas crónicamente presentan abortos de manera endémica, como consecuencia de una transmisión transplacentaria endógena. Por el contrario, las granjas que sufren una primera exposición a la infección por el contacto con ooquistes esporulados presentan un brote de abortos (30-57%) que son debidos a una transmisión transplacentaria exógena (Trees & Williams, 2005; Dubey *et al.*, 2007).

En este sentido, la transmisión transplacentaria endógena aparece como el modo de transmisión predominante en muchos rebaños, mientras que existe controversia en cuanto a la relevancia de la transmisión transplacentaria exógena para dar lugar a una infección crónica (McCann *et al.*, 2007; Dijkstra *et al.*, 2008).

d) Transmisión horizontal

El perro es el huésped definitivo de la enfermedad, contaminando con su materia fecal las pasturas, aguas y alimentos donde las vacas conviven y al ingerir dichos focos de contaminación adquieren la enfermedad (Aycachi, 2005).

El contagio horizontal se produce por la ingestión de tejidos bovinos infectados o de ooquistes que contaminan el medio ambiente (formas de resistencia del parásito eliminadas por los perros con las heces luego de ingerir tejidos infectados de un hospedador intermediario) (Cuddon; 2002).

2.4 Signos clínicos

La infección por *Neospora caninum* en el ganado bovino no gestante es, generalmente, asintomática, mientras que en animales gestantes tiene como signo clínico más relevante el aborto (Dubey, 2005).

El aborto es el único signo clínico observado en las vacas infectadas. Los fetos pueden fallecer intrauterino, con reabsorción, maceración o aborto; no obstante, las terneras pueden nacer vivas con enfermedad o pueden ser clínicamente normales, pero con infección crónica (Radostis, *et al*, 2002).

Éste puede ocurrir a partir del tercer mes de gestación, aunque suele observarse con más frecuencia entre los 5 y 7 meses (Dubey *et al.*, 2007; Almería & López-Gatius, 2013).

Si la infección ocurre en el primer tercio de la gestación, el feto suele ser reabsorbido y lo que se observa, clínicamente, es una repetición del celo. No obstante, no se ha encontrado una asociación entre la infección por *N. caninum* y el fallo reproductivo temprano (Almería & López-Gatius, 2013).

Por otra parte, si la muerte fetal se produce entre los meses 3 y 8 de gestación, el feto suele ser eliminado presentando una autólisis moderada. Sin embargo, algunos fetos que mueren antes del quinto mes podrían momificarse y quedar retenidos en el útero durante meses (Dubey, 2005).

Si la infección ocurre en etapas de la gestación más avanzadas, a partir del quinto mes, disminuye el riesgo de muerte fetal y el signo más frecuente será el nacimiento de terneros sanos, pero congénitamente infectados que generalmente, presentarán anticuerpos precolostrales (Quintanilla-Gonzalo *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2000).

Las lesiones producidas por *Neospora caninum* son más graves en los fetos abortados en el primer y segundo tercio de gestación que en aquellos abortados al final de la misma (Collantes-Fernández *et al.*, 2006).

Las vacas infectadas muestran una disminución en la producción de leche durante la primera lactancia, produciendo aproximadamente 1 litro menos de leche/vaca/día que las vacas no infectadas, tienen tendencia al aborto y presentan una posibilidad mayor de ser eliminadas del rebaño a una edad menor (Radostis., *et al.*, 2002).

2.5 Lesiones

Las lesiones asociadas a la infección se pueden observar en diversos órganos, dependiendo de la etapa y gravedad de la misma, siendo, en general, de naturaleza inflamatoria no supurativa. En la placenta se suelen observar focos de necrosis y zonas de intensa inflamación con infiltración de células mononucleares que, en procesos avanzados, pueden progresar hacia la

regeneración conjuntiva con hiperplasia, fibrosis e incluso calcificación de los focos necróticos (Barr et al., 1994b; Maley *et al.*, 2003).

Estas infiltraciones comienzan primero en las carúnculas maternas y luego se extienden al cotiledón fetal, con aparición de áreas de hemorragia y necrosis. Con frecuencia se observa separación de la carúncula y el cotiledón con liberación de suero en el septo materno-fetal. Las lesiones placentarias son más graves y la necrosis más amplia cuando se ha producido muerte fetal que cuando el feto sobrevive (Gibney *et al.*, 2008).

En el SNC, este parásito invade de forma activa neuronas y astrocitos, por lo que provoca trastornos neuromusculares graves por destrucción de las células nerviosas, incluyendo nervios craneales y espinales, afectando la transmisión del impulso nervioso (Mayhew *et al.*, 1991; Dubey & de Lahunta, 1993).

2.6 Inmunidad

Neospora caninum es un parásito intracelular obligado, por lo cual tanto la respuesta de anticuerpos, cuya puesta en evidencia es de gran ayuda en el diagnóstico y en estudios epidemiológicos, como los mecanismos implicados en la respuesta celular son importantes elementos de la respuesta inmune frente a *Neospora caninum*. En este sentido, los diversos estudios de la respuesta inmune desarrollada por el hospedador frente al parásito, tanto en el modelo murino como en el modelo bovino han demostrado que tras la infección se induce una respuesta inmune humoral y celular. (McAllister *et al.* 2000)

Dichos mecanismos se ponen en funcionamiento en los primeros momentos tras la infección, activándose componentes de la inmunidad innata

como células dendríticas, células NK y macrófagos. Estos tipos celulares actúan como primera línea de defensa, destruyendo las células infectadas por el parásito y liberando citoquinas del tipo IL-12 e IFN- γ (Boysen *et al.*, 2006; Klevar *et al.*, 2007; Strohmusch *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2010; Dion *et al.*, 2011).

La resistencia a parásitos Apicomplexa está asociada a una respuesta inmunitaria T helper 1 (Th1) mediada por linfocitos T CD4, con producción de IFN- γ (interferón gamma), IL-12 (interleucina 12), FNT- α (factor de necrosis tumoral α) e IgG2 (inmunoglobulina G2) (Innes *et al.*, 2001; 2002). La respuesta Th1 se desencadena en respuesta al parásito, al comienzo de la preñez genera una serie de procesos inmunopatológicos que son incompatibles con el mantenimiento de la gestación. Por otro lado, en la gestación tardía, cuando la respuesta Th1 es moderada, la lesión en la placenta es menor y el feto sobrevive (Innes *et al.*, 2002). La disminución de la transmisión vertical en las sucesivas preñeces y el bajo nivel de repeticiones de abortos en animales infectados sugieren la existencia de mecanismos inmunitarios adaptativos de protección (McAllister *et al.*, 2000).

La respuesta inmune Th2, es favorecida por los altos niveles de progesterona y se encarga de mantener la preñez a través de la producción de IL4, IL5, IL6, IL9 e IL10, así mismo disminuye la producción de moléculas pro-inflamatorias como IL12 e IFN- γ , siendo estas últimas perjudiciales para la vida fetal (Quinn, Ellis & Smith, 2002).

Uno de los mecanismos más importantes durante el proceso de rechazo fetal establece un desequilibrio entre la respuesta Th1/Th2 a favor de la respuesta Th1 alterando el sincitiotrofoblasto, por consiguiente, se genera la

producción de IFN- γ que es capaz de interferir sobre ese tejido directamente causando abortos espontáneos, y otras citoquinas asociadas a este tipo de respuesta (Innes *et al.*, 2001).

2.7 Diagnóstico

Para el diagnóstico de la neosporosis bovina se deben analizar el feto, y los sueros del feto y de la madre. Frecuentemente, los resultados que sugieren la neosporosis como causa de aborto, cobran solidez cuando no hay indicios de la acción de otra enfermedad abortigénica. La identificación de *Neospora caninum* en los tejidos de fetos o terneros perinatales, mediante técnicas directas, ofrecen mayor certeza al diagnóstico (Echaide, 2000).

El diagnóstico de la neosporosis bovina se hace complejo debido a la falta de signos clínicos patognomónicos y a su fácil asociación con otro tipo de enfermedades que generan problemas reproductivos entre ellos el aborto (Campero, 2002). Sin embargo, se hace indispensable asociar la anamnesis, el estado sanitario de la explotación, la presentación de signos clínicos y lesiones halladas, aun así, el diagnóstico final que confirmará la presencia de la enfermedad será dado por pruebas que identifiquen antígenos o anticuerpos contra *Neospora caninum* (Cebrián *et al.*, 2003).

Por otra parte, técnicas como IFI, micro aglutinación, inmunoblot y un considerable número de ELISA han sido descritos considerablemente. Estas técnicas varían en sus características, cualidades y sus objetivos como prueba. Algunas son optimizadas para la detección de animales seropositivos mientras que otras preferentemente reconocen rodeos que han tenido episodios de aborto por infección con *Neospora caninum*. Un número de ELISA han sido también

modificados para estudios de avidéz de los anticuerpos encontrados en animales infectados (Björkman *et al.*, 1999; Maley *et al.*, 2001; Schares *et al.*, 2002). A nivel mundial, no existe ningún protocolo estandarizado para su diagnóstico (Dubey *et al.*, 2007). En establecimientos con problemas de abortos, deberían llevarse a cabo la serología materna de vacas abortadas y vacas gestantes del mismo rodeo, así como también el examen de los fetos y de las placentas (Anderson *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2007)

2.8 Tipos de Diagnostico

a) Inmunoblot (IB)

El inmunoblot o electrotransferencia, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas de los taquizoitos. Luego son transferidas a una membrana adsorbente, típicamente de nitrocelulosa o de PVDF (polifluoruro de vinilideno) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella (Towbin *et al.*, 1979 & Renart *et al.*, 1979). Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas. Como el IB combina la resolución de la electroforesis en gel con la especificidad de detección inmunoquímica, el método tiene una alta especificidad. Sin embargo, es también una técnica engorrosa, consume tiempo y diferentes laboratorios informaron sobre variación en la sensibilidad (Baszler *et al.*, 1996).

b) Inmunofluorescencia indirecta IFAT

Diferentes estudios realizados en distintas especies animales han demostrado que esta técnica presenta una muy baja reactividad cruzada con otros parásitos coccidiales. Por esto IFAT es utilizada frecuentemente como prueba serológica de referencia para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* (Lasri *et al.*, 2004). Una característica de esta técnica es la de preservar la morfología del parásito y detectar antígenos de membrana, no existiendo reacción cruzada. La IFI detecta, fundamentalmente, anticuerpos que se unen a los antígenos localizados en la superficie celular de *Neospora caninum*. Se considera como resultado positivo cuando se observa la fluorescencia en toda la superficie del taquizoíto, que normalmente aparece cuando se analizan sueros con títulos moderados o altos. El patrón de IFI varía cuando se analizan sueros con títulos bajos, reduciéndose considerablemente la fluorescencia o quedando restringida a la parte apical del taquizoíto. Sin embargo, el resultado de la fluorescencia apical también puede aparecer como resultado de reacciones cruzadas con *T. gondii*, *Eimeria* spp, *T. gondii* y *N. caninum*, ya que contienen epítomos comunes asociados al complejo apical (Sasai; 1998).

c) Microaglutinacion

La microaglutinación es una prueba serológica relevante en el diagnóstico de la neosporosis. No requiere conjugados de difícil adquisición y permite analizar sueros de varias especies simultáneamente. Tiene alta repetitividad entre operarios, es barata, de fácil lectura, utiliza poco equipamiento y materiales (Moore., *et al*, 2001).

e) ELISA

Se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo, un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre. Además, se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de amplificación de la señal (luminiscentes, cascadas enzimáticas,) que han permitido elevar la sensibilidad de algunos ELISA (Cabrera *et al.*, 2000). Este método ha tenido una enorme aplicación en aquellos campos en los que se precisa la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales etc. (Georgieva *et al.*, 2006).

Las pruebas ELISA basadas en la proteína recombinante presentan niveles mayores de sensibilidad y especificidad que las basadas en lisados de taquizoitos completos (Radostitis., *et al*, 2002). Esta técnica, utiliza los anticuerpos a los que se han enlazado covalentemente las enzimas de modo que quedan sin alteración las propiedades catalíticas de la enzima y la especificidad del anticuerpo. Las enzimas enlazadas, típicamente incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina y galactosidasa, todas las cuales catalizan reacciones cuyos productos son de color y se pueden determinar en cantidades muy pequeñas (Gamón, 2003).

Dentro de los tipos de ELISA, el más utilizado es ELISA indirecto, el cual emplea antígeno soluble de taquizoito, mezcla de antígenos intracelulares y de membranas de los diferentes aislados de *Neospora caninum*, puede ser usado con muestra de suero, leche y líquidos fetales para la detección de anticuerpos, además los resultados pueden ser expresados como valores de Densidad Óptica (OD), valores Porcentuales de Positividad (PP), o valores de cociente entre Muestra/Control Positivo (S/P). (Ortega-Mora *et al.*, 2006)

La técnica de ELISA, tiene la ventaja del costo/tiempo, ante exámenes de un gran número de muestras de suero de bovinos, lo cual es aplicable en hatos en los cuales es necesario el análisis de un gran número de animales. En cuanto a especies menores, los laboratorios de diagnóstico veterinario, reciben pocas muestras, tal es el caso de las muestras de perros, por lo cual en estos casos el IFI es utilizado como examen de rutina, por causa de su flexibilidad (Bjorkman *et al.*, 1999)

En la práctica, el ELISA indirecto que emplea antígeno soluble, mezcla de antígenos intracelulares y de membrana de los diferentes aislados de *Neospora caninum*, es la técnica de diagnóstico que se emplea con mayor frecuencia en la detección de anticuerpos específicos en suero y líquidos fetales (Bjorkman., 1999)

ELISA indirecto. Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones conteniendo el antígeno, se incuban con anticuerpos marcados que indican la presencia de antígeno en la solución analizada; es necesario incluir controles negativos. Los controles positivos y negativos son los mismos, el sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el

antígeno y uno secundario marcado contra el primario; la detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal de vida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más empleado como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran cantidad de antígenos (Williams *et al.*, 1999).

2.9 Diagnóstico no serológico

A) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR ha sido notable, permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos. Debido a la alta eficiencia que tiene *Neospora caninum* para transmitirse en forma vertical, los resultados positivos por IHQ o PCR deberán estar siempre asociados a problemas reproductivos y utilización de otras técnicas diagnósticas, no sólo para identificar dicho protozoo sino también para descartar otras causas de aborto. El aislamiento de *N. caninum* es difícil y costoso como técnica diagnóstica, se han logrado aislamientos en regiones ganaderas de todo el mundo (Williams *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2005).

Los órganos generalmente usados para este fin son el cerebro, corazón e hígado ya que estos son los órganos comúnmente más afectados, así mismo se ha informado que mediante PCR es posible detectar ADN del parásito en células como leucocitos, linfocitos y sangre, lo cual demuestra la presencia del parásito de manera directa en animales vivos con infecciones naturales o experimentales (Santana *et al.*, 2010).

B) Inmunohistoquímica (IHQ)

La técnica se lleva a cabo en tejidos fetales conservados en formol al 10% y que posean lesiones compatibles por histopatología con *Neospora caninum*; la IHQ logra identificar con gran precisión al parásito por lo que adquiere un importante valor diagnóstico, aun así se debe tener presente que la sensibilidad es baja, esto se debe a la baja población de parásitos que pueden ser hallados en tejidos autolizados, por esta misma razón, continúa siendo una técnica vigente y necesaria ya que la visualización e identificación de los parásitos sólo con la tinción de hematoxilina y eosina (Moore *et al.*, 2001).

Las lesiones más significativas son: meningoencefalitis necrotizante multifocal, miocarditis y miositis no supurativa, nefritis, hepatitis periportal no supurativa, neumonía intersticial y adrenalitis focales no supurativas. Mediante IHQ se observan taquizoitos de *Neospora caninum*, aislados o en ocasiones, agrupados en forma de racimo, los cuales reaccionan positivamente con el antisuero primario utilizado. Los mismos están asociados a los focos inflamatorios y/o necróticos en el cerebro (Campero, 2002).

2.10 Tratamiento

El éxito del tratamiento depende en gran parte del tiempo de evolución de la enfermedad y del daño ya producido (Cuddon; 2002). En la actualidad, no hay un tratamiento efectivo para las vacas infectadas que pueda prevenir la transmisión vertical (Anderson *et al.* 2000; McAllister y Latham, 2002; Dubey, 2003).

Sin embargo, experimentos en ratones han evidenciado que el uso de los anticoccidiales derivados de la triazina, como toltrazuril y ponazuril, previenen la

formación de lesiones cerebrales y además disminuye la detección de DNA parasitario por medio de PCR en más de 95% (McAllister y Latham, 2002).

Aún no existe información concluyente respecto a la eficacia de la vacuna muerta en reducir la infección fetal o abortos en vacas infectadas o en prevenir la infección post natal en vacas no infectadas. Sin embargo, estudios preliminares indican que la vacuna tiene la capacidad de reducir la incidencia de abortos, pero no genera protección contra la transmisión vertical del parásito (Valenzuela, 2005).

2.11 Control y Prevención

El control se basa principalmente en eliminar los animales infectados y evitar la transmisión tanto vertical como horizontal (Cebrián, Barberán y Ferrer, 2003). En la actualidad, las vacunas que se encuentran disponibles a nivel mundial son vacunas muertas, aun así, su eficacia en la prevención de la infección congénita ha demostrado ser deficiente. Uno de los principales problemas de la vacunación es que todos los animales serán seropositivos por lo que el uso de la serología como diagnóstico se hace imposible de utilizar en un hato (Valenzuela, 2005), (Jiménez y Zambrano, 2012).

Evitar el acceso de perros y otros carnívoros a los recintos ganaderos, especialmente a los almacenes de alimentos, para evitar la contaminación fecal, rápida eliminación de placentas, fetos abortados y animales muertos para evitar su ingestión por carnívoros y desinfección de los materiales contaminados por el aborto (Rojas; 2003).

Se ha comprobado una asociación epidemiológica entre perros y vacas con serología positiva, es recomendable disminuir el contacto entre estos animales. En este mismo sentido, debe disminuirse la contaminación fecal de alimentos y agua, además se deben retirar los tejidos potencialmente infectados, como fetos abortados y membranas fetales (Dubey, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Dijkstra *et al.*, 2001; McAllister y Lathman, 2002; Dubey, 2003).

Otra medida de control de la Neosporosis podría incluir la transferencia de embriones a vacas negativas a *Neospora caninum*, ya que es improbable que este patógeno se transmita por esa vía debido a que los embriones bovinos con zona pelúcida intacta en estado de pre implantación son resistentes a la invasión de este parásito. De esta manera se estaría también controlando la transmisión vertical de la enfermedad. La vaca donadora positiva a *Neospora caninum* será estimulada hormonalmente para producir varios embriones en forma simultánea, los cuales serán recuperados y transferidos a vacas receptoras libres de *Neospora caninum*. De esta manera, los embriones tendrán la calidad genética de la madre donadora, pero serán retirados antes que ocurra la transmisión transplacentaria. (Dubey *et al.*, 2007)

Realizar exámenes serológicos a las hembras para reposición, tanto las nacidas en el hato, como las adquiridas de otras ganaderías (Valverde, 2007).

Realizar controles sanitarios en el ganado, durante un manejo reproductivo tecnificado como lo es la inseminación artificial y la transferencia de embriones, resulta conveniente para evitar la transmisión vertical del *Neospora caninum* (Dubey *et al.*, 2007)

2.12 Antecedentes

A nivel mundial, la Neosporosis fue descrita por primera vez en caninos como un síndrome neuromuscular causado por un protozoo intracelular *Neospora caninum*, dicho agente posteriormente es relacionado como causante de la disminución en la producción de carne, leche y de abortos en vacunos; tiene distribución mundial y se señalan tasas elevadas en rebaños de carne y leche, así para Inglaterra se reportan 6,000 abortos anuales con una pérdida de 800 dólares americanos por cada aborto (Moore *et al.*, 2005).

Para las provincias de Santa Fé y Córdoba de Argentina, se establece una seroprevalencia de 24,4% en fetos abortados, 64,5% en bovinos lecheros y 92,3% para vacunos de carne; para Estados Unidos 10% de prevalencia, Nueva Zelanda 38%, Francia 26%, Suiza 21%, Holanda 17%, Austria 34,1%, para Reino Unido la estimación es 12,5% de abortos, en España se determinaron tasas de prevalencia de 17,9% en fetos bovinos abortados y 83,2% en rebaños lecheros y para México 36,5% (Andresen, 1999).

En vacas lecheras de la raza Holstein de Vietnam del Sur obtuvo 53% de prevalencia (Duong, 2004). En la provincia este de Turquía de 185 sueros de vacunos lecheros, se reportó una prevalencia del 13,48% y en 89 vacas preñadas con historia de repeticiones de celo, la prevalencia para Neosporosis fue de 3,19% (Samisimsek *et al.*, 2008).

A nivel nacional, en la investigación sobre agentes comunes involucrados en abortos del ganado lechero en el valle de Lima al estudiar 126 fetos abortados determinó que el 40% presentaban antígenos de *Neospora caninum*, sugiriendo

este agente, como la principal causa de abortos y pérdidas embrionarias (Rivera, 2000).

En una muestra de bovinos lecheros del valle de Lima, se reporta una seroprevalencia para *Neospora caninum* del 40.83% \pm 8.79% (Silva, 2003). En un estudio en perros de establos lecheros del valle de Lima, se obtuvo una prevalencia de 32.7 \pm 9.0% de *N. caninum* (Del Campo *et al.*, 2003).

Neospora caninum, es un parásito ampliamente conocido como causante del abortos y mortalidad neonatal en bovinos a nivel mundial; en el Perú esta infección está presente en bovinos de las principales cuencas lecheras: 57% en Arequipa, 42.9% en Cajamarca, Lima 29.6%, 40.38% y en perros de establos lecheros de Lima 32.7% (Horna *et al.*, 2003).

En otro estudio del mismo autor para determinar la presencia de *Neospora caninum*, en caninos de dos distritos de la provincia de Chachapoyas y Amazonas, evaluó 142 sueros de caninos, 63 de Molinopampa y 79 de Leymebamba; determinando que el 28.9 7.5% de caninos, presentaron anticuerpos contra *Neospora caninum*, representando seroprevalencias de 34.9% y 24.1% respectivamente; los resultados demuestran una seroprevalencia moderadamente alta en caninos infectados con *Neospora caninum* (Horna *et al.*, 2003).

En la serie histórica de seroprevalencias en zonas zo ecológicas: La campiña, San Isidro, San camilo, Santa Rita, La Cano, Yuramayo, La Joya, El pedregal de la Región Arequipa (Manrique, 2007) determinó para el año 2000 (56,2%), 2001 (22,7%), 2002 (67,9%), 2003 (50,8%), 2004 (68,4%) y 2005 (66.6%). Al estudiar la presencia de Neosporosis en bovinos lecheros de 2 a más

años de Molinopampa y Leymebamba de la provincia de Chachapoyas- Amazonas reporta una prevalencia del 40,4% (Quevedo *et al.*, 2003)

A nivel regional, en el estudio para establecer la seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos lecheros criados al pastoreo de la provincia de Melgar, departamento de Puno evaluó 419 sueros obtenidos en forma aleatoria de siete fundos ganaderos, mediante la detección de anticuerpos séricos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), obtuvo una prevalencia general de $18.1 \pm 3.7\%$ (Atoccsa *et al.*, 2005). Para el CIP Chuquibambilla, provincia de Melgar, se obtiene una prevalencia del 15,28% (Huarachi, 2005).

La seroprevalencia de *Neospora caninum*, en Taraco fue de 9,42%, Progreso 8, 49% y 0% para Cabanillas. La coexistencia de DVB y *Neospora caninum* de ambos agentes en el huésped bovino, para Taraco fue de 5,07%, Progreso 5,66% y 0% para Cabanillas (Laura E. 2010).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

El trabajo de investigación se desarrollo en el distrito de Caracoto, de la provincia de San Román, región Puno. Se encuentra ubicado en las coordenadas 15°34'09"S 70°06'26"O, según el INEI, posee una superficie total de 285.87 km². Limita al norte con el distrito de Juliaca, al este con el distrito de Huata y Coata, al oeste con el Distrito de Cabana (San Román) y al sur con la Provincia de Puno. Su capital Caracoto se encuentra a una altura 3825 msnm. (SENAMHI, 2012).

El análisis de laboratorio se realizó en el Laboratorio de Salud animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia con sede en el C.I.P – Chuquibambilla de la UNA-PUNO

3.2 Material de estudio

Se utilizaron vacunos de la raza Brown Swiss del Distrito de Caracoto tomando los siguientes criterios de inclusion:

Hembras menores y mayores a dos años

Machos menores a dos años

Vacas en seca y producción

Vacas preñadas y vacias

Criterios de exclusión

Machos > 2 años

3.3. Toma de Muestra de Suero Sanguíneo

Se tomaron aproximadamente 6.0 mL de sangre de la vena yugular, en tubos vacutainer al vacío sin anticoagulante a 85 vacunos, con el fin de favorecer el activador de coagulación, tubos fueron colocados en posición inclinada a temperatura ambiente durante un aproximado de 2 horas, luego se centrifugó a 3500 rpm x 5 minutos, posteriormente los sueros sanguíneos se aislaron en viales y se mantuvieron en congelación a -20°C , hasta el momento del análisis en el laboratorio de Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia con sede en el C.I.P - Chuquibambilla.

3.4 Muestra

Se determinó el tamaño de muestra utilizando el muestreo por conveniencia (85 animales) de las comunidades de Collana, Chillora, Acopata, San Antonio de Chujura

Para lo cual se distribuyó los animales de la siguiente manera.

Sexo	Hembras	Machos	Hembras (>) A 2 Años			
Edad / estado reproductivo	Menores (<) a 2	Menores (<) a 2 años	Vacías / sin producción	Vacías / en producción	Preñadas / sin producción	preñadas / en producción
Nº de animales	17	11	11	18	15	13
Sud total	28		57			
Total	85					

3.5. Materiales para la toma de muestras sanguíneas

- Aguja Hipodérmica 20 G. X 1 pulgada.

- Frascos colectores de suero sanguíneo (viales criogénicos) x 2mL
- Tubos vacutainer de 6 mL
- Algodón.
- Alcohol yodado al 3%
- Lapiceros de tinta indeleble.
- Pipetas automáticas y manuales.
- Guantes de exploración.

3.6. Materiales para la prueba de ELISA.

- Micropipetas de precisión.
- Tips de 10 μ l y de 100 μ l
- Probetas graduadas de 500 μ l
- Bandejas.
- Papel toalla.
- Algodón.
- Agua destilada

3.7. Reactivos.

- Placa tapizado con antígeno de *Neospora caninum*.
- Control negativo (Negativo control ELISA 1 x 0.9 ml)
- Control positivo (Positivo control ELISA 1 x 0.9 ml)
- Conjugado 1 x 24ml

- Diluyente de la muestra.
- Substrato TMB n.º12.
- Solución de frenado n.º3
- Solución de lavado concentrada (10X).

3.8. Equipos de Laboratorio

- Estufa incubadora a 37°C
- Refrigeradora convencional
- Congeladora a -20°C
- Potenciómetro.
- Cronómetro de tiempo.
- Lector de ELISA ChroMate Manager
- Micro pipeta canal simple 20 a 200 µl.
- Micropipeta canal simple 100 a 1000 µl
- Micro pipetas multicanal 50 – 300 UI

3.9. Metodología

Prueba de ELISA Kit IDEXX Neospora, proporciona un método rápido, simple, sensible y específico para detectar anticuerpos frente a la *Neospora caninum* en muestras de suero y plasma de rumiantes.

a) Descripción y principios según inserto IDEXX.

Las placas de microtitulación se suministran tapizadas con antígeno inactivado. Las diluciones de las muestras que van a ser procesadas se incuban en los pocillos. Cualquier anticuerpo específico frente a *Neospora caninum* se une al antígeno que tapiza los pocillos y forma un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo. El material que no ha quedado unido se elimina de los pocillos mediante lavado. A continuación, se añade un conjugado formado por una IgG antirumiante unida al enzima peroxidasa, el cual es susceptible de unirse a los anticuerpos de rumiantes que formaron el complejo con el antígeno de *Neospora caninum*. El conjugado no unido se elimina mediante lavado, y se añade un sustrato TMB a los pocillos. El grado de color desarrollado (densidad óptica medida a 450nm, tras la adición de la solución de frenado) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo específico frente a *Neospora caninum* presente en la muestra. La relevancia diagnóstica del proceso se obtiene comparando la densidad óptica de los pocillos con muestra, con la densidad óptica de los pocillos que contienen el control positivo.

b) Procesamiento de la prueba de ELISA según inserto IDEXX.

Se obtuvo la placa tapizada con antígeno.

Se dispuso 90 µl de Diluyente de muestra en cada pocillo.

Se dispuso 10 µl de control positivo (CP) no diluido en pocillos duplicados.

Se dispuso 10 µl de control negativo (CN) no diluido en pocillos duplicados.

Se dispuso 10 µl de muestra no diluida en los pocillos apropiados.

Se mezcló el contenido de los pocillos golpeando levemente la placa

Se cubrió la placa e incubamos a 60 minutos (± 5 min) a $+37^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$)

Se eliminó el contenido líquido de cada pocillo y lavamos cada pocillo con aproximadamente 300 μl de solución de lavado 3 veces. Después de lavado final, eliminamos el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente.

Se dispense 100 μl conjugado en cada pocillo.

Se cubrió la placa para incubar durante 60 min. (± 5 min.) a $+37^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$).

Se eliminó el contenido líquido de cada pocillo y lavamos cada pocillo con aproximadamente 300 μl de solución de lavado 3 veces. Después de lavado final, eliminamos el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente.

Se dispense 100 μl de sustrato TMB n.º12 en cada pocillo.

Se incubó a $18-26^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos (± 1 min).

Se dispense 100 μl de solución frenado n.º3 en cada pocillo.

Y finalmente leímos los resultados a una longitud de onda de 450 nm.

c) Cálculo de seroprevalencia

El Cálculo de la seroprevalencia fue mediante la siguiente fórmula

$$Prevalencia (\%) = \frac{\text{Número de muestras positivas}}{\text{Número total de muestra}} \times 100$$

Cálculos de control de Kit ELISA según inserto IDEXX

Control Negativo (CN)

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A (450) + CN2 A (450)}{2}$$

Control Positivo (CP)

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A (450) + CP2 A (450)}{2}$$

Muestras:

$$M/P \% = 100 X \frac{\text{Muestra A (450)} - CN X}{CP X - CN X}$$

Interpretacion

Negativo: M/P % < 30

Dudoso: $30 \leq M/P \% < 40$

Positivo: M/P % ≥ 40

Método estadístico

Los datos cuantitativos discretas de la variable estudiada fue analizada mediante la prueba estadística de Ji – cuadrada, cuya fórmula es la siguiente:

$$X_c^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Dónde:

X_c^2 = Valor calculado de Ji cuadrado

o_{ij} = Valor observado de casos positivos o negativos

e_{ij} = Valor esperado de casos positivos o negativos

III. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Seroprevalencia general de *Neospora caninum*

La variable Prevalencia de *Neospora caninum* en vacunos de las comunidades del Distrito de Caracoto, de las 85 muestras tomadas se encontraron 4 animales que presentan anticuerpos contra *Neospora caninum* (4.71%) de prevalencia de la enfermedad del total de muestras tomadas. Mientras que 81 animales muestreados representan un 95.29% que no presentaban anticuerpos contra *Neospora caninum*.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, mediante técnica de ELISA indirecta, resultan ser inferiores a comparación de (Laura, E. 2010), quien encontró 9.42% de prevalencia en vacunos del distrito de Taraco, 8.49% de prevalencia para vacunos del Centro Poblado de Progreso.

Estos valores son inferiores en comparación al estudio reportado por (Atoccsa, 2005) con la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la Provincia de Melgar, con 18.10 % de prevalencia. Igualmente, (Huarachi, 2008) reporta en vacunos Brown Swiss y criollos del CIP Chuquibambilla 15.28 %, a su vez señala que el hospedador definitivo es el perro quien cumple el rol de propagar el parásito y contaminar el pastizal en las zonas de pastoreo.

Los valores encontrados en el presente estudio son inferiores al reporte de (Silva, 2003), quién en muestras de bovinos lecheros del valle de Lima, encuentra una seroprevalencia de 40.83% \pm 8.79% para *Neospora caninum*. A estos resultados (Horna *et. al.*, 2003) manifestando que el *Neospora caninum*, es un parásito ampliamente conocido como causante del abortos y mortalidad

neonatal en bovinos a nivel mundial; en el Perú esta infección está presente en bovinos de las principales cuencas lecheras: 57% en Arequipa, 42.9% en Cajamarca, Lima 29.6%, 40.38% y en perros de establos lecheros de Lima 32.7%. En Arequipa según zonas zo ecológicas: La campiña, San Isidro, San camilo, Santa Rita, La Cano, Yuramayo, La Joya, El pedregal (Manrique, 2007) determinó en el año 2000 (56,2%), 2001 (22,7%), 2002 (67,9%), 2003 (50,8%), 2004 (68,4%) y 2005 (66.6%) de presencia de Neosporosis en bovinos lecheros.

Thurmond *et al.* (1997) menciona que las diferencias en la prevalencia varían en función del país, región, técnica diagnóstica utilizada, tamaño de muestra seleccionado y características del muestreo. A su vez, existen trabajos que demuestran una asociación entre la seroprevalencia y los factores de manejo (Barling *et al.*, 2001; Fort *et al.*, 2015). Según nuestro resultado en la zona de estudio existiría una propagación de *Neospora caninum*, debido probablemente a que existen animales infectados con el parásito.

4.2. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos según sexo

Los resultados del estudio de prevalencia de *Neospora caninum* en vacunos del distrito de Caracoto; se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Prevalencia de *Neospora caninum* en vacunos menores de dos años del Distrito Caracoto – San Román – Puno, según sexo.

Sexo	Número Total	Positivos	Porcentaje (%)
Machos	11	1	9.09
Hembras	17	1	5.88

Fuente: Anexo tabla n° 1

A la prueba de significancia de asociación mediante Ji-cuadrado es bajo ($P>0.05$), el cual nos indica estadísticamente que el sexo no influye en la prevalencia de *Neospora caninum* en vacunos.

Los resultados del presente estudio son seroprevalencias inferiores, que podría deberse a la escasa y esporádica introducción de animales de reemplazo en los hatos de las comunidades. Barber (1998) manifiesta que no existe una mayor susceptibilidad por raza o sexo.

Moore *et al.* (2005), manifiesta que los machos con *Neospora caninum* se comportarían como hospedadores intermediarios, pues estos podrían diseminar al protozoo a través del semen.

4.3. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos según edad

Los resultados del estudio de prevalencia de *Neospora caninum* en vacunos del distrito de Caracoto; se presenta en la siguiente tabla 2.

Tabla 2. Prevalencia de *Neospora caninum* en vacunos del distrito Caracoto – San Román – Puno, según edad.

Edad animal	Número Total	Positivos	Porcentaje (%)
Menor a 2 años	28	2	7.14
Mayor a 2 años	57	2	3.51

Fuente: Anexo tabla n °2

A la prueba de significancia de asociación mediante Ji-cuadrado es bajo ($P>0.05$), el cual nos indica estadísticamente que la edad no está asociada a la prevalencia de *Neospora caninum* en vacunos.

Con respecto a nuestro resultado no se encuentra una relación entre la edad y la seropositividad. Anderson *et al.*, (1997) menciona que la infección de

Neospora caninum es más evidente en vaquillas que en vacas y decrece con el número de partos, al parecer la inmunidad maternal se va incrementando con la edad.

Sin embargo, Bedoya, *et al.* (2018), en estudios de seroprevalencia de *Neospora caninum* en Colombia, indica que, según la edad, las prevalencias más bajas se encontraron en animales jóvenes de 17 meses de edad (19,8%) y que las más altas prevalencias se encontraron en hembras mayores de 3 años de edad (31.1%; $p < 0.05$). Según Pare *et al.* (1996) indica que la Neosporosis difiere de la edad de los animales.

4.4. Seroprevalencia de *Neospora caninum* según estado reproductivo

Los resultados del estudio de prevalencia de *Neospora caninum* en vacunos del distrito de Caracoto; se presenta en la siguiente tabla 3.

Tabla 3. Prevalencia de en vacas según estado reproductivo del distrito de Caracoto – San Román - Puno, según estado reproductivo.

Vacas	Produccion	Numero total	Positivos	Porcentaje (%)
Preñadas	Preñadas S/P	15	0	0
	Preñadas C/P	13	2	15.38
Vacías	Vacías S/P	11	0	0
	Vacías C/P	18	0	0

Fuente: Anexo tabla n° 3

A la prueba de significancia de asociación mediante Ji-cuadrado es bajo ($P > 0.05$), el cual nos indica estadísticamente que el estado reproductivo no está asociada a la prevalencia de *Neospora caninum* en vacunos. De manera similar, Bedoya, *et al.* (2018) no encontró diferencias de seroprevalencia de *Neospora*

caninum de acuerdo al estado de lactación, producción de leche, gestación y estado de gestación ($P > 0.05$).

Shares *et al.*, (1998) manifiesta que la transmisión de *Neospora caninum* entre madre y cría puede ser mantenida por varias generaciones, pues una de las vías de contagio principales es la transplacentaria. Radostis *et al.*, (2002) manifiesta que vacas en estado de producción disminuyen 1 litro la producción de leche por día, lo cual esto afectaría al productor generándole pérdidas.

Estos valores encontrados en el presente son inferiores a los reportes de (Rivera, 2000) donde determinó un 40% de *Neospora caninum* en el valle de Lima, como principal causa de abortos y pérdidas embrionarias.

En los hatos de Gran Bretaña y Nueva Zelanda, las tasas de aborto anual fueron de 16 y 30% respectivamente. Los abortos en el ganado debido a *N. caninum*, se reportan en fetos de aproximadamente 3.5 meses de gestación a término (Dubey *et al.*, 1997; Slotved *et al.*, 1999).

En Argentina para las provincias de Santa Fé y Córdoba, se registra una seroprevalencia de 24,4% en fetos abortados, 64,5% en bovinos lecheros y 92,3% para vacunos de carne; para Estados Unidos 10% de prevalencia, Nueva Zelanda 38%, Francia 26%, Suiza 21%, Holanda 17%, Austria 34,1%, para Reino Unido 12,5% de abortos, en España tasas de 17,9% en fetos bovinos abortados y 83,2% en rebaños lecheros y para México 36,5% (Andersen, 1999).

Cebrian *et al.*, (2003) reporta que el aborto en ganado lechero estaría relacionado con el manejo, la mayor densidad de animales en explotaciones intensivas y la mayor facilidad de que los alimentos se contaminen con heces del

hospedador definitivo. Asimismo, es más fácil que los abortos pasen desapercibidos en ganaderías extensivas (Cebrián 2003).

IV. CONCLUSIONES

Los anticuerpos contra *Neospora caninum* en los bovinos Brown Swiss de las comunidades del distrito de Caracoto están presentes con una seroprevalencia de 4.71%

La seroprevalencia encontrada de *Neospora caninum* es independiente de la edad, afectando de igual forma a los menores de 2 años y mayores de 2 años de la raza Brown Swiss del distrito de Caracoto.

La seroprevalencia encontrada de *Neospora caninum* es independiente del sexo, afectando de igual forma a machos y hembras de la raza Brown Swiss del distrito de Caracoto.

La seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacas en estado reproductivo, preñadas con producción es independiente, pues este parásito afecta de igual forma tanto a preñadas y vacías con producción o sin producción, en vacas en secas no se encontró ningún caso positivo pero esto no indica que el parásito se encuentre ausente.

V. RECOMENDACIONES

Se debe implementar programas de vigilancia permanente a nivel de agente hospedero intermedio y definitivo, para evitar la ocurrencia de la enfermedad.

Establecer registros de control donde se puedan identificar a las vacas que muestran antecedentes con problemas de abortos.

No alimentar a los perros con fetos y placentas, ya que esto seria un factor predisponente para su diseminación del protozoo.

Realizar estudios posteriores para identificar y controlar la diseminación del parasito puesto que estos establos de se encuentran cercanos a zonas urbanas

VI. BIBLIOGRAFIA

- Almería S, López-Gatius F, (2013). *Bovine neosporosis: clinical and practical aspects*. Research in veterinary science 95 (2), 303-309.
- Anderson, M. L., C. W. Palmer, M. C. Thurmond, J. P. Picanso, P. C. Blanchard, R. E. Breitmeyer, A. W. Layton, M. McAllister, B. Daft, and H. Kinde. (1995). *Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California*. J.Am.Vet.Med.Assoc. 207:1206-1210.
- Andresen H. (1999). *Neosporosis en el Perú y en el Mundo*. Mv. Revista de Ciencias Veterinarias.
- Andresen H. (2009) *Problemas Reproductivos*. (en línea) (Consultado:15/12/2010.) URL disponible: <http://handresen.perulactea.com/2009/05/19/capitulo-8-problemas-reproductivos/>
- Anderson, M. L., P. C. Blanchard, B. C. Barr, J. P. Dubey, R. L. Hoffman, and P. A. Conrad. (1991). *Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle*. J.Am.Vet.Med.Assoc. 198:241-244.
- Anderson M, Andrianarivo A, Conrad P. (2000). *Neosporosis in cattle*. Anim Reprod Sci; 60-61: 417-431.
- Atoccsa J., Chávez A., Casas E., Falcón P. (2005). *Seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros criados al pastoreo en la provincia de Melgar, Puno*. Rev. Inv. Vet. Perú. Vol. 16, Lima enero/junio.
- Aycachi R. (2005) *Neospora caninum –Parasitología*. Agosto (Internet). (Consultado 20/02/ 2011.) Disponible: <http://www.monografias.com/trabajos30/neospora-caninum/neosporacaninum.shtml>
- Baszler, T.V., Knowles, D.P., Dubey, J.P., Gay, J.M., Mathison, B.A., McElwain, T.F. (1996). *Serological diagnosis of bovine neosporosis by Neospora caninum monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay*. J Clin Microbiol. 34(6): 1423-1428.

- Barber, J. S. (1998). Neosporosis Canina. Waltham Focus Volumen 8 No 1.
- Barling, K.S., McNeill, J.W., Paschal, J.C., McCollum F.T., Craig, T.M., Adams, L.G., Thompson, J.A. (2001). *Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for Neospora caninum in consignments of beef calves in Texas, USA*. Prev Vet Med. 52(1): 53-61.
- Barr, B.C., Conrad, P.A., Dubey, J.P., Anderson M. L. (1991). *Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity*. J Vet Diagn Invest. 3: 39-46.
- Barr, B. C., P. A. Conrad, R. Breitmeyer, K. Sverlow, M. L. Anderson, J. Reynolds, A. E. Chauvet, J. P. Dubey, and A. A. Ardans. (1993). *Congenital Neospora infection in calves born from cows that had previously aborted Neospora-infected fetuses: four cases (1990-1992)*. J.Am.Vet.Med.Assoc. 202:113-117.
- Barr BC, Rowe JD, Sverlow KM (1994), *Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolate*. J Vet Diagn Invest. 6: 207–215
- Barr B, Bjerkäs I, Buxton D, Conrad P, Dubey J, Ellis J, Jenkins M, Johnston S, Lindsay D, Sibley D, Trees A, Wouda W. (1997). *Neosporosis. Report of the international Neospora workshop*. Parasitology; 19:120-126.
- Bartels, C.J., Wouda, W., Schukken, Y.H. (1999). *Risk factors for Neospora caninum associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997)*. Theriogenology. 52: 247-257.
- Bartels, C.J.M., Arnaiz-Seco, J.I., Ruiz S, Bjorkman,(2006). *Supranational comparison of Neospora caninum seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden*. Vet Parasitol. 137(1): 17-27.
- Baszler, T.V., Knowles, D.P., Dubey, J.P., Gay, J.M., Mathison, B.A., McElwain, T.F. (1996). *Serological diagnosis of bovine neosporosis by Neospora caninum monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay*. J Clin Microbiol. 34(6): 1423-1428.

- Basso, W.; L. Venturi; M. Rambeaud; J. Uazaga; D. Bacigalupe. (1999). *Prevalencia de infección por Neospora caninum en perros de ciudad y del tambo*. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Acapulco, México. p 90.
- Bedoya H, Guimaraes M, Martins R, Polo G, Caetano A, (2018). *Seroprevalence and risk factors for Neospora caninum infection in cattle from the eastern Antioquia, Colombia*. Veterinary and Animal Science, Volume 6, Pages 69-74.
- Bjerkäs I, Mohn S, Presthus J. (1984) *Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dog*. Z Parasitenk; 70: 271-274.
- Bjerkäs I, Jenkins M, Dubey J. (1994). *Identification and characterization of Neospora caninum tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis*. Clinic Diag Lab Immunol; 1: 214-221.
- Bjorkman, C., Naslund, K., Stenlund, S., Maley, S. W., Buxton, D., Uggla, A. (1999). *An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic Neospora caninum infection*. J Vet Diagn Invest. 11(1): 41-44.
- Bjorkman, C., Alenius, S., Manuelsson, U., Uggla, A. (2000). *Neospora caninum and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion*. Vet J. 159: 201-206.
- Bovilis N. Neosporosis en Uruguay. Intervet. (1999).
- Boulton, J. G., P. A. Gill, R. W. Cook, G. C. Fraser, P. A. Harper, and J. P. Dubey. (1995). *Bovine Neospora abortion in north-eastern New South Wales*. Aust.Vet.J. 72:119-120.
- Boysen P, Klevar S, Olsen I, Storset AK, (2006). *The protozoan Neospora caninum directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts*. Infection and immunity 74 (2), 953-960.
- Buxton D, McAllister MM, Dubey JP, (2002) *The comparative pathogenesis of neosporosis*. Trends in parasitology 18 (12), 546-552.

- Cabrera M., Ortíz P., Claxto J., Williams D., Trees A. (2000). *Evidencia serológica de infección por Neospora caninum en ganado vacuno en el Perú*. IV Congreso de Parasitología. 212 p.p.
- Calandra, Patricio., et al., (2014). *Neosporosis epidémica y endémica: descripción de dos eventos en bovinos para cría*. *Revista Argentina De Microbiología*, 46(4), 315-319.
- Campero, Carlos. (2002). *Pérdidas Provocadas por Neospora caninum en Bovinos*. *Disertación de la reunión de Especialistas en Parasitología Veterinaria de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay 11° Encuentro de Veterinarios Endoparasitólogos Rioplatenses*. Tandil 22 al 24 de Mayo del 2002.
- Cebraín L. Barberán M. Ferrer L. (2003) *Neosporosis y Aborto en elGanado Bovino*. Dpto. de Patología Animal. Facultad de Veterinaria Zaragoza.
- Collantes Fernandez, E., Arnaiz Seco, I., Burgos, B.M., Rodriguez Bertos, A., Aduriz, G., Fernandes Garcia, A., Ortega Mora, L.M. (2006). *Comparison of Neospora caninum distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases*. *Vet Parasitol.* 142(1): 187-191.
- Conrad P.A, Sverlow K, Anderson, Bondurant R, Tuter G, Palmer C, (1993). *Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental Neospora infections*. *J Vet Diagn Invest.* 5: 572-578.
- Cordero del Campillo M, Rojo F, Martínez A, Sánchez C, Hernández S, Navarrete I, (1999) *Parasitosis del sistema reproductor*. 1ª Edición. Madrid: McGrawHill – Interoamericana. Pág. 330, 331, 332.
- Cuddon, P. (2002). *“Acquired canine peripheral neuropathies”*. *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 32 (1): 207-249.
- Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. (1999). *Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of Neospora caninum infections in dairy cattle*. *Int.J.Parasitol.* 29:1683-1689.

- Del campo J., Chávez A., Delgado A., Falcon N., Ornelas A., Casas E., Serrano E. (2003). *Frecuencia de Neospora caninum en perros de establos lecheros del Valle de Lima*. Rev. Inv. Vet. Perú 14(82): 145-149
- Dijkstra, T., Barkema, H.W., Hesselink, J.W., Wouda. W. (2002). *Point source exposure of cattle to Neospora caninum consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog*. Vet Parasitol. 105: 89-98.
- Dijkstra T, Lam TJ, Bartels CJ, Eysker M, Wouda W, (2008). *Natural postnatal Neospora caninum infection in cattle can persist and lead to endogenous transplacental infection*. Veterinary parasitology 152 (3-4), 220-225.
- Dion S, Germon S, Guiton R, Ducournau C, Dimier-Poisson I, (2011). *Functional activation of T cells by dendritic cells and macrophages exposed to the intracellular parasite Neospora caninum*. International journal for parasitology 41 (6), 685-695.
- Dirección Regional Agraria Puno. (2006)
- Dubey, J. P. and A. d. Lahunta. (1993). *Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf*. Appl.Parasitol. 34:229-233.
- Dubey JP, Lindsay DS, (1996). *A review of Neospora caninum and neosporosis*. Veterinary parasitology 67 (1-2),1-59.
- Dubey JP, Hattel A, Lindsay D, Topper M. (1998) *Neonatal Neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission*. Am Vet Med Assoc; 193:1259-1263.
- Dubey, J. P. (1999). *Recent advances in Neospora and neosporosis*. Vet.Parasitol.84:349-367.
- Dubey JP, Barr B, Barta J, Bjerkäs I, Björkman C, Blagburn B, Bowman D, Buxton D, Ellis J, Gottstein B, Hemphill A, Hill D (2002). *Redescription of Neospora caninum and its differentiation from related coccidia*. Int J Parasitol ; 32:929-946.

- Dubey JP, Zarnke R, Thomas N, Wong S, Van Bonn W, Briggs M, Davis J, Ewing R, Mense M, Kwok O, Romand S, Thulliez P. (2003). *Toxoplasma gondii, Neospora caninum, Sarcocystis neurona, and Sarcocystis canis-like infections in marine mammals*. Vet Parasitol. 116:275-296.
- Dubey JP, (2005). *Neosporosis in cattle*. The Veterinary clinics of North America. Food animal practice 21 (2), 473-483.
- Dubey, J.P., G. Schares, and L. Ortega-Mora (2007). *Epidemiology and control of Neosporosis and Neospora caninum*. Clin Microbial Rev. 20: 323-367.
- Dubey JP, Schares G, (2011). *Neosporosis in animals--the last five years*. Veterinary parasitology 180 (1-2), 90-108.
- Duong Chi Mai (2004). *Neospora caninum and bovine viral diarrhoea virus infections in dairy cattle*. Depart. Of Clinical Vet. Med. usspala Sweden P.O. Box 7017, SE 75007.
- Echaide I, (2000) *La Neosporosis Bovina. Jornada sobre enfermedades emergentes del bovino*. Santa Fe –Argentina.
- Escalona, Jorge., García, Francisco., Mosquera, Ortelio., Vargas, Francisco., y Corro, Ana. (2010). *Factores de riesgo asociados a la prevalencia de eosporosis Bovina en el municipio Bolívar del estado Yaracuy, Venezuela*. Zootecnia Tropical, 28(2), 201-212.
- Eva L. Chauca (2010). *Seroprevalencia y Factores de Riesgo Asociados al Virus de 441 la Diarrea Viral Bovina (VDVB) y Neospora caninum en tres cuencas lecheras de la región Puno*.
- Feng X, Zhang N, Tuo W, (2010). *Neospora caninum tachyzoite- and antigen-stimulated cytokine production by bone marrow-derived dendritic cells and spleen cells of naive BALB/c mice*. The Journal of parasitology 96 (4), 717-723.
- Fernandez B.C, Gennari, S.M., Souza, S.L., Carvalho, J.M., Olivera, W.G., Cury, M.C. (2004). *Prevalence Of Anti-Neospora caninum Antibodies In Dogs From Urban, Periurban And Rural Areas Of The City Of Uberlândia, Minas Gerais-Brazil*. Veterinary Parasitology 123. Issues 1-2. Pages 33-40.

- Fredes M., Fernando G. (2000). *La Neosporosis una parasitosis Emergente*. Tecno Vet. Diciembre N° 6.
- Fredes, Fernando. (2002). *Algunos antecedentes sobre Neospora Caninum y Neosporosis*. *Monografías De Medicina Veterinaria*, 22(1-2), 3-9. Recuperado de: <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/viewFile/1026/907>
- Fisher, M., y J, McGarry. (2007). *Fundamentos de Parasitología en Animales de Compañía 1ra Edición (español)*. Editorial Inter-Medica. Buenos Aires.
- Fort M.; Edelsten M.; Maley S.; Innes E. (2015). *Seroepidemiological study of Neospora caninum in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina*. *Acta Parasitol.* 60(2): 000–000; ISSN 1230-2821.
- Gamon J. (2003). *Detección de anticuerpos de Neospora caninum en la zona norte de la cuenca lechera del departamento de Santa Cruz*. (Tesis de Grado). (En línea). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Bolivia Disponible en: http://www.fcv.uagrm.edu.bo/sistemabibliotecario/doc_tesis/GAMON%20A.%20EDUARDO-20101119-105009.pdf
- Georgieva, D., Prelezov, P., Koinarski, T. (2006). *Neospora caninum and neosporosis en animals A. review*. *Bulg. J. Vet. Med.* 9, N°1, 1-26.
- Gibney EH, Kipar A, Rosbottom A, Guy CS, Smith RF, Hetzel U, Trees AJ, Williams DJ, (2008). *The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following Neospora caninum infection in early and late gestation correlates with foetal death*. *International journal for parasitology* 38 (5), 579-588.
- Gondim LF, Laski P, Gao L, McAllister MM, (2004). *Variation of the internal transcribed spacer 1 sequence within individual strains and among different strains of Neospora caninum*. *The Journal of parasitology* 90 (1), 119-122.

- Gondim, L.F.P., McAllister, M.M., Pinilla, N.E., Pitt, W.C., & Mech, L.D. (2004). *Transmission of Neospora Caninum between wild and domestic animals*. Iranian Journal Of Parasitology, 90(6), 1361-1365.
- Horna, S., Chávez, A., Rivera H., Casas, E., Serrano, E. (2003) *Seroprevalencia de Neospora caninum en caninos de dos distritos de la provincia de Chachapoyas*. Rev. Invest. Vet. Perú. Vol. 14, No 2 Lima juldic.
- Huarachi, G. (2005). *Seroprevalencia de Neospora caninum en vacunos del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Provincia de Melgar -Puno*. Tesis Mev. Vet y Zoot. UNA-Puno.
- Ignacio E. Echaide. (2000). *Jornada sobre enfermedades emergentes del bovino*. INTA Rafaela, provincia de Santa Fe – Argentina
- Innes , E. A., Andrianarivo, A.G Bjorkman, C, Williams, D.J. (2002). Immune responses to Neospora caninum and prospects for vaccination. Trends Parasitol. 18: 497-504.
- Innes , E.A., Wright, S.E. Maley. S., Rae, A., Schock, A. Kirvar, E. Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M,. (2001). *Protection against vertical transmission in bovine neosporosis*. Int J Parasitol. 31: 1523-1534.
- Iván Perera Martínez, (2015). *Manejo de hembras durante la gestación, el parto y la lactancia de las crías*. Editorial – elearning – España 2015.
- Jiménez, C. y Zambrano, J. (2012). *Enfermedades que afectan la reproducción bovina en Colombia, no sujeta a control oficial*. (2a ed., 53-57). Bogotá: Produmedios.
- King J.S., Slapeta J., Jenkins D.J., Al-qassab S.E., Ellis J.T., Windsor P.A., (2010). *Australian dingoes are definitive hosts of Neospora caninum*. Int J Parasitol. 40(8): 945-950.
- Klevar S, Kulberg S, Boysen P, Storset AK, Moldal T, Björkman C, Olsen I, 2007. *Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with Neospora caninum in calves*. International journal for parasitology 37 (3-4), 329-339.

- Lasri S, De Meerschman F, Rettigner C, Focant C, Losson B. (2004). *Comparison of three techniques for the serological diagnosis of Neospora caninum in the dog and their use for epidemiological studies*. Vet Parasitol; 123: 25-32.
- Lindsay, D., J.P. Dubey, and R.B. Duncan. (1999). *Confirmation that the dogs is a definitive hosts for Neospora caninum*. Vet Parasitol.
- Mainato, Matías. (2011). *Neosporosis bovina. Monografía, previa a la Obtención del título de Médico Veterinario y Zootecnista*. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Maley, S.W, Buxton, D., Thomson, K.M., Schiriefer, C.S., Inne, E.A. (2001). *Serological analysis of calves experimentally infected with Neospora caninum: a 1-year study*. Vet Parasitol. 96: 1-9.
- Maley S, Buxton D, Rae A, Wright S, Schock A, Bartley P, Esteban-Redondo I, Swales C, Hamilton C, Sales J, Innes E. (2003) *The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation*. J Comp Path; 129:186-195.
- Manrique, G. (2007). *Series históricas 2000-2005 de seroprevalencia de Diarrea viral bovina (DVB), Rinotraqueitis infecciosa (IBR) y Neosporosis bovina por zonas zoológicas de la Región Arequipa*. Revista Medicina A de la Producción, LABVETSUR.
- Martínez, Alexander., Moreno, Giovanni., y Cruz, Anastasia. (2012). *Actualización de la Neosporosis Bovina*. Conexión Agropecuaria, 2(1), 50-66.
- Manrique, G. (2007). *Series históricas 2000-2005 de seroprevalencia de Diarrea viral bovina (DVB), Rinotraqueitis infecciosa (IBR) y Neosporosis bovina por zonas zoológicas de la Región Arequipa*. Revista Medicina A de la Producción, LABVETSUR.
- Mayhew, I. G., K. C. Smith, J. P. Dubey, L. K. Gatward and N.J. McGlennon. (1991). *Treatment of encephalomyelitis due to Neospora caninum in a litter puppies*. J. Small Anim. Pract. 32, 609-612.

- McAllister ,M.M., Dubey J.P Lindsay, D.S., Jolley, W.R . Wills, R. A McGuire, A.M. (1998). *Dogs are definitive hosts of Neospora caninum*. Int J Parasitol. 28: 1473-1478.
- McAllister, M.M., Bjorkan, C. Anderson-Sprecher, R. Rogers. D.G. (2000). Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. J Am Vet Med Assoc. 217: 881-887.
- Mcallister D, Latham S. (2002) *Neospora Trends in Parasitol*; 18: 4-5.
- McCann CM, McAllister MM, Gondim LF, Smith RF, Cripps PJ, Kipar A, Williams DJ, Trees AJ, (2007). *Neospora caninum in cattle: Experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy*. International journal for parasitology 37 (14), 1631-1639.
- Montiel, Tomas., Romero, Dora., García, Zaferino., Medina, Leticia., y Cruz, Carlos. (2011). *Neosporosis bovina en ranchos ganaderos de la zona norte del estado Veracruz, México*. Tropical And Subtropical Agroecosystems, 13, 469-479. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93920942025>.
- Moore D. Odeón A y Campero C. (2001) Vet. Ar: *Neosporosis bovina*. Dic. (Consultado 05/02/2011) Vol. XVIII. N° 180: 752. Disponible: http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/sanidad/enf_repro/MooreNcanimun.PDF
- Moore, D., Odeon A, Venturini, M., Campero, C. (2005). *Neosporosis bovina: Conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación*. Rev. Argent. Microbiol. Vol. 37 N° 4, oct/dic. ISSN 0325-7541
- Ortega-Mora LM, Fernández-García A, Gómez-Bautista M, (2006). *Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives*. Acta Parasitologica 51 (1), 1-14.
- Otranto, D., Llazarí, A., Testini, G., Traversa, D., Di Regalbano, A.F., Badan, M., Capelli, G. (2003). *Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy*. Vet Parasitol.118(1): 7-18.

- Oviedo T, Betancur C, Maestra A, González M, Mestra P, Reza L. Rev.MVZ: *Estudio serológico sobre neosporosis en bovinos con problemas reproductivos en Montería, Córdoba, Colombia. Junio (2006). Vol. 12(1): Pág. 929-933. URL Disponible en: www.unicordoba.edu.co/revistas/revistamvz/mvz-121/121-7.pdf.*
- Paré, J., M. C. Thurmond, and S. K. Hietala. (1996). *Congenital Neospora caninum infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. Can.J.Vet.Res. 60:133-139.*
- Paz, V. (2005). *Neosporosis en Bovinos y caninos. Mon. Electr. Patol Vet. 2(1): 17- 33. ISSN 0718-0780*
- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozaolo, A., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L. M. (2000). *Observational studies in Neospora caninum infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on Neospora caninum. Int. J. Parasitol. 30: 906-909.*
- Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Björkman C, Uggla A. (1999). *Neospora caninum infection and repeated abortions in humans. Emerg Infect Dis; 5: 278-280.*
- Puray N, Chávez A, Casas E, Falcón N, Casas G. (2006). *Prevalencia de Neospora caninum en bovinos de una empresa ganadera de la Sierra Central del Perú. Rev Inv Vet Perú 17: 189-194.*
- Quevedo, V., Chavez A, Rivera, H., Casa, E., Serrano, E. (2003). *Neosporosis en bovinos lecheros de dos distritos de la provincia de Chachapoyas. Rev. Investg. Vet. Perú Vol 14n en/jun, p.p.1-6. ISSN 1609-9117.*
- Quinn, H.E., Ellis, J.T., Smith, N.C. (2002). *Neospora caninum: a cause of immune-mediated failure of pregnancy. Trends Parasitol. 18: 391-394.*
- Quintanilla-Gozaolo A, Pereira-Bueno J, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega Mora LM, (2000). *Observational studies in Neospora caninum infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody*

- fluctuations. In: Hemphill A, Gottstein B. A European perspective on Neospora caninum. International journal for parasitology 30, 877-924.*
- Radostis, Otto. (2002). Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. (9a ed.). Madrid: S.A. Mcgraw-Hill / Interamericana de España.
- Renart, J., Reiser, J., Stark, G.R. (1979). *Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.* Proc Natl Acad Sci USA. 76 (7): 3116-3120.
- Rivera, H., Nelson, D., Tabachi, L. (2000). *Neospora caninum y otros agentes en 471 fetos abortados de bovinos lecheros del valle de Lima.* Rev. Inv. Pec. IVITA (Perú).
- Rivera, H. (2001). Etiología infecciosa del aborto bovino. Rev. Inv. Vet. Perú Supl. 1: 95-99.
- Rojas, C.M. (2003). Neosporosis canina. Rev virt parasitol vet peru. 2003
- Santana, Omar., Cruz, Carlos., Medina, Leticia., Ramos, Miguel., Castellanos, Ciro., y Quezada, Daniel. (2010). *Neospora caninum: Detección de ADN en sangre durante la primera gestación de vaquillas infectadas naturalmente.* Publicación digital de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 41(10), 131-137. Recuperado de: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/Veterinaria-Mexico/article/view/18362>.
- Samisimsek Armagan, Erdem Utuk, Ergum koroglu, Nazir Dumanli, Alí Risvanli. (2008). *Seroprevalence of Neospora caninum in repeat breeder dairy cows in Turkey.* Arch. Tierz Dummerstorf.
- Sasai, K., Lillehoj, H. S., Hemphill, A., Matsuda, H., Hanioka, Y., Fukata, T., Baba, E., Arakawa, A. (1998). *A chicken anti-conoid monoclonal antibody identifies a common epitope which is present on motile stages of Eimeria, Neospora, and Toxoplasma.* J.Parasitol. 84, 654-656.

- Silva, P. (2003). *Seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros del valle de Lima*. Tesis de Médico Veterinario, facultad de Med. Veterinaria UNMSM. Lima, Perú.
- Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Barwald, A., Conraths, F.J. (1998). *The efficiency of vertical transmission of Neospora caninum in dairy cattle analysed by serological techniques*. Vet Parasitol. 80: 87-98.
- Schares, G., Barwald, A., Staubach, C., Sondgen, P., Rauser, M., Schroder, R., Peters, M., Wurm, R., Selhorst, T., Conraths, F.J. (2002). *P38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic Neospora caninum-associated bovine abortion*. Vet Parasitol. 106: 293-305.
- Schares G., Bärwald A., Staubach C., Ziller M., Klob D., Wurm R., Rauser R M., Labohm R., Dräger K., Fasen W., Hess R.G., Conraths F.J. (2003). *Regional distribution of bovine Neospora caninum infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by logistic regression*. Int J Parasitol. 33: 1631-1640.
- Schares G, Barwald A, Staubach C, Wurm R, Rauser M, Conraths FJ, Schroeder C, (2004). *Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against Neospora caninum in bovine milk*. Veterinary parasitology 120 (1-2), 55-63.
- Silva, P. (2003). *Seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros del valle de Lima*. Tesis de Médico Veterinario, facultad de Med. Veterinaria UNMSM. Lima, Perú.
- Samisimsek Armagan, Erdem Utuk, Ergum koroglu, Nazir Dumanli, Alí Risvanli. (2008). *Seroprevalence of Neospora caninum in rep.eat breeder dairy cows in Turkey*. Arch. Tierz Dummerstorf.
- Špilovská, Silvia., Reiterová, Katarina., & Antolová, Daniela. (2015). *Neospora caninum - Associated Abortions in Slovak Dairy Farm*. Iranian Journal Of Parasitology, 10(1), 96-101. Recuperado de: <http://ijpa.tums.ac.ir/index.php/ijpa/article/view/347>.

- Strohbusch M, Müller N, Hemphill A, Margos M, Grandgirard D, Leib S, Greif G, Gottstein B, (2009). *Neospora caninum* and bone marrow-derived dendritic cells: parasite survival, proliferation, and induction of cytokine expression. *Parasite immunology* 31 (7), 366-372.
- Thilsted, J.P., Dubey, J.P. (1989). *Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle*. *J Vet Diagn Invest*. 1(3): 205-209.
- Tranas J, Heinzen R, Weiss L, Mcallister M. (1999). *Serological evidence of human infection with the protozoan Neospora caninum*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*; 765-767.
- Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM, (1999). *Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis*. *International journal for parasitology* 29 (8), 1195-1200.
- Trees AJ, Williams DJL, (2005). *Endogenous and exogenous transplacental infection in Neospora caninum and Toxoplasma gondii*. *Trends in parasitology* 21 (12), 558-561.
- Towbin, H., Sstaehelin, T., Gordon, J. (1979). *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76 (9): 4350-4354
- Valenzuela P. *Neosporosis en bovinos y caninos*. *Monografías Electrónica de Patología Veterinaria*. (2005) Vol.:2(1): Págs.: 17-33.
- Valerde, E. (2007) *Epidemiología de la Neosporosis en los rumiantes (Monografía de grado)* Universidad de Cuenca: Págs. 29, 30, - 32.
- Vignau, María., Venturini, Lucila., Romero, Jorge., Eiras, Diego., y Basso, Walter. (2005). *Parasitología práctica y Modelos de Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos*. Buenos Aires: Universidad Nacional de La Plata.
- Williams, D.J., Davison, H.C., et al. (1999). *Evaluation of a comercial ELISA for detecting serum, antibody to Neospore caninum in cattle*. *Vet.Rec.*1999; 154:571-575.

Williams DJ, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DF, Trees AJ, (2000). *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121 (Pt 4), 347-358.

Zambrano, Jorge., Cotrino, Víctor., Jiménez, Claudia., Romero, Mariana., y Guerrero, Bernardo. (2001). *Evaluación Serológica de Neospora Caninum en Bovinos en Colombia*. *Revista Acovez*, 26(1). Recuperado de: <https://encolombia.com/veterinaria/publi/acovez/ac261/acovez26101evaluacion/>.

VII. ANEXOS

Cuadro 1. Resultados ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.239	0.235	0.199	0.164	0.223	0.226	0.238	0.234	0.207	1.985	0.24	0.227
B	0.207	0.209	0.243	0.202	0.225	0.231	0.253	0.285	0.249	0.248	0.24	
C	1.747	0.226	0.239	0.267	0.23	0.235	0.207	0.211	1.364	0.213	0.21	
D	1.68	0.232	0.215	0.251	0.255	0.23	0.205	0.235	0.22	0.262	0.191	
E	0.189	0.223	0.239	0.244	0.212	0.244	0.228	0.243	1.592	0.226	0.236	
F	0.218	0.214	0.247	0.209	0.232	0.223	0.246	0.277	1.601	0.201	0.455	
G	0.195	0.203	0.211	0.221	0.231	0.251	0.176	0.195	0.18	0.192	0.224	
H	0.238	0.25	0.234	0.255	0.252	0.254	0.185	0.218	0.209	0.24	0.24	

Calculo de Promedio Control Negativo

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A (450) + CN2 A (450)}{2}$$

Donde:

$$CN1 = 0.239$$

$$CN2 = 0.207$$

$$CN\bar{x} = \frac{CN1 A (450) + CN2 A (450)}{2}$$

Calculo de Promedio Control Positivo

$$CP\bar{x} = \frac{CP1 A (450) + CP2 A (450)}{2}$$

Donde:

$$CP1: 1.747$$

$$CP2: 1.68$$

$$CN\bar{x} = \frac{1.747 (450) + 1.68 (450)}{2}$$

$$CN\bar{x} = 771.075$$

Criterios de validación

$$CN\bar{x} \leq 0.500 \quad CP\bar{x} \leq 2.000 \quad CP\bar{x} - CN\bar{x} \geq 0.300$$

Calculo de muestras

$$M/P \% = 100 X \frac{\text{Muestra A (450)} - CN X}{CP X - CN X}$$

Cuadro 2. Muestras según inserto IDEXX de *Neospora caninum*

N° Muestra	Densidad Optica	M/P %	Resultado
1	0.189	-2.2811137	Negativo
2	0.218	-0.3354579	Negativo
3	0.195	-1.8785642	Negativo
4	0.238	1.0063737	Negativo
5	0.235	0.80509896	Negativo
6	0.209	-0.9392821	Negativo
7	0.226	0.20127474	Negativo
8	0.232	0.60382422	Negativo
9	0.223	2.12E-15	Negativo
10	0.214	-0.6038242	Negativo
11	0.203	-1.3418316	Negativo
12	0.25	1.81147266	Negativo
13	0.199	-1.6101979	Negativo
14	0.243	1.3418316	Negativo
15	0.239	1.07346528	Negativo
16	0.215	-0.5367326	Negativo
17	0.239	1.07346528	Negativo
18	0.247	1.61019792	Negativo
19	0.211	-0.805099	Negativo
20	0.234	0.73800738	Negativo
21	0.164	-3.9584032	Negativo

22	0.202	-1.4089232	Negativo
23	0.267	2.95202952	Negativo
24	0.251	1.87856424	Negativo
25	0.244	1.40892318	Negativo
26	0.209	-0.9392821	Negativo
27	0.221	-0.1341832	Negativo
28	0.255	2.14693056	Negativo
29	0.223	2.12E-15	Negativo
30	0.225	0.13418316	Negativo
31	0.23	0.46964106	Negativo
32	0.255	2.14693056	Negativo
33	0.212	-0.7380074	Negativo
34	0.232	0.60382422	Negativo
35	0.231	0.53673264	Negativo
36	0.252	1.94565582	Negativo
37	0.226	0.20127474	Negativo
38	0.231	0.53673264	Negativo
39	0.235	0.80509896	Negativo
40	0.23	0.46964106	Negativo
41	0.244	1.40892318	Negativo
42	0.223	2.12E-15	Negativo
43	0.251	1.87856424	Negativo
44	0.254	2.07983898	Negativo
45	0.238	1.0063737	Negativo
46	0.253	2.0127474	Negativo
47	0.207	-1.0734653	Negativo
48	0.205	-1.2076484	Negativo
49	0.228	0.3354579	Negativo
50	0.246	1.54310634	Negativo
51	0.176	-3.1533043	Negativo
52	0.185	-2.54948	Negativo
53	0.234	0.73800738	Negativo
54	0.285	4.15967796	Negativo
55	0.211	-0.805099	Negativo
56	0.235	0.80509896	Negativo

57	0.243	1.3418316	Negativo
58	0.277	3.62294532	Negativo
59	0.195	-1.8785642	Negativo
60	0.218	-0.3354579	Negativo
61	0.207	-1.0734653	Negativo
62	0.249	1.74438108	Negativo
63	1.364	76.5514928	Positivo
64	0.22	-0.2012747	Negativo
65	1.592	91.848373	Positivo
66	1.601	92.4521972	Positivo
67	0.18	-2.8849379	Negativo
68	0.209	-0.9392821	Negativo
69	1.985	118.215364	Positivo
70	0.248	1.6772895	Negativo
71	0.213	-0.6709158	Negativo
72	0.262	2.61657162	Negativo
73	0.226	0.20127474	Negativo
74	0.201	-1.4760148	Negativo
75	0.192	-2.079839	Negativo
76	0.24	1.14055686	Negativo
77	0.24	1.14055686	Negativo
78	0.24	1.14055686	Negativo
79	0.21	-0.8721905	Negativo
80	0.191	-2.1469306	Negativo
81	0.236	0.87219054	Negativo
82	0.455	15.5652466	Negativo
83	0.224	0.06709158	Negativo
84	0.24	1.14055686	Negativo
85	0.227	0.26836632	Negativo

Resultados de prueba de chi-cuadrado

SEGÚN SEXO

Tabla 1 cruzada Sexo*Resultado

			Resultado		
			Positivo	Negativo	Total
Sexo	Hembra	Recuento	1	10	11
		Recuento esperado	,8	10,2	11,0
	Macho	Recuento	1	16	17
		Recuento esperado	1,2	15,8	17,0
Total	Recuento		2	26	28
	Recuento esperado		2,0	26,0	28,0

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,104 ^a	1	,747		
Corrección de continuidad ^b	,000	1	1,000		
Razón de verosimilitud	,101	1	,750		
Prueba exacta de Fisher				1,000	,640
Asociación lineal por lineal	,100	1	,752		
N de casos válidos	28				

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,79.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

SEGÚN EDAD

Tabla 2 cruzada Edad*Resultado

		Resultado		Total	
		SI	NO		
Edad	< a 2 años	Recuento	2	26	28
		Recuento esperado	1,3	26,7	28,0
	> a 2 años	Recuento	2	55	57
		Recuento esperado	2,7	54,3	57,0
Total	Recuento	4	81	85	
	Recuento esperado	4,0	81,0	85,0	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	,553 ^a	1	,457		
Corrección de continuidad ^b	,039	1	,842		
Razón de verosimilitud	,521	1	,470		
Prueba exacta de Fisher				,595	,400
Asociación lineal por lineal	,546	1	,460		
N de casos válidos	85				

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,32.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

ESTADO REPRODUCTIVO:

Tabla 3 cruzada Estado reproductivo*Resultado

		Resultado	Resultado		Total
			SI	NO	
Estado reproductivo	Preñada	Recuento	2	26	28
		Recuento esperado	1,0	27,0	28,0
	Vacía	Recuento	0	29	29
		Recuento esperado	1,0	28,0	29,0
Total	Recuento	2	55	57	
	Recuento esperado	2,0	55,0	57,0	

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	2,147 ^a	1	,143		
Corrección de continuidad ^b	,555	1	,456		
Razón de verosimilitud	2,919	1	,088		
Prueba exacta de Fisher				,237	,237
Asociación lineal por lineal	2,109	1	,146		
N de casos válidos	57				

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,98.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

Figura 1: Vacuno raza Brown Swiss



Figura 2: Toma de Muestras

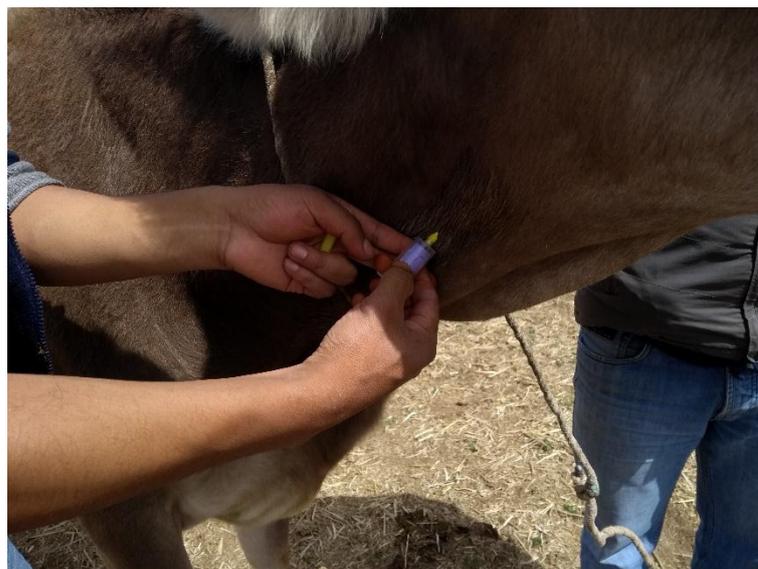


Figura 3: Registro de toma de muestras



Figura 4. Muestras de Suero

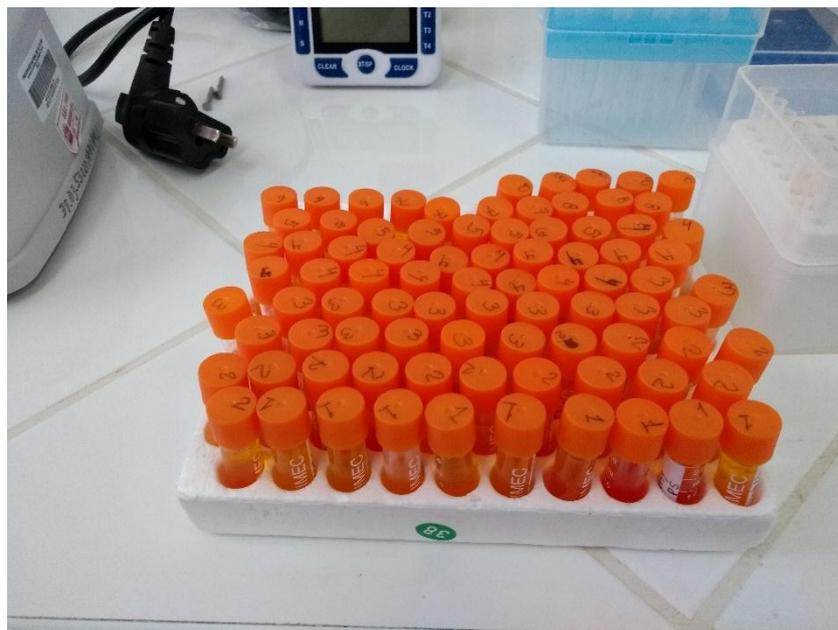


Figura 5. Placa tamizada con antígeno de *Neospora Caninum*



Figura 6. Suero sanguíneo distribuido en la placa tamizada con antígeno



Figura 7. Lectura de Densidad Óptica



Figura 8. Procesamiento de Muestras

