

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final:
**RELEVAMIENTO SEROLOGICO DE NEOSPOROSIS
BOVINA EN PEQUEÑOS PRODUCTORES DE LA
CUENCA LECHERA COLONIA AURORA EN LA
PROVINCIA DE MISIONES.**

Autor: **Mercado Felipe**
DNI: 36.480.084

Director: **Giraud José Ángel**
Co-Director: **Sticotti Erika Elizabeth**

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la
Comisión Evaluadora:

(Nombres)

Fecha de Presentación: ____/____/____

Secretario Académico



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

Proyecto de Trabajo Final Presentado Para Optar al
Grado de Médico Veterinario
Modalidad: Trabajo de investigación

RELEVAMIENTO SEROLÓGICO DE NEOSPOROSIS
BOVINA EN PEQUEÑOS PRODUCTORES DE LA CUENCA
LECHERA COLONIA AURORA EN LA PROVINCIA DE
MISIONES

Mercado Felipe

36480084

Director: **Giraudó José Angel**

Co-director: **Sticotti Erika Elizabeth**

Río Cuarto - Córdoba

Abril / 2017

DEDICATORIA

A mis padres Claudio y Yai por darme la oportunidad de estudiar una carrera universitaria y apoyarme en el transcurso de la misma.

A mis hermanos Martin y Esteban que me acompañan en todo momento.

A mi amigo y compañero Alejandro con el que transitamos esta etapa de la vida juntos.

A mis compañeros y amigos que conocí en la facultad.

AGRADECIMIENTOS

A Cuchi mi director de tesis por sus aportes en la realización de la misma.

A Érika que me acompañó y ayudó en este trabajo, por su dedicación y compromiso con la docencia.

A la cátedra de Pasantías a Campo que realiza el viaje a Misiones.

A los evaluadores Gabriel y Manuel.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	vi
RESUMEN.....	vii
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. DEFINICIÓN.....	3
2.2. TAXONOMÍA.....	3
2.3. CICLO DE VIDA.....	4
2.4. TRANSMISIÓN.....	5
2.5. FACTORES DE RIESGO DE INFECCIÓN.....	7
2.6. PATOGENIA.....	9
2.7. SIGNOS CLÍNICOS.....	11
2.8. DIAGNÓSTICO.....	11
2.8.1 PRUEBAS SEROLÓGICAS.....	13
2.9. CONTROL.....	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTORES.....	17
3.2. MUESTREO.....	17
3.3. ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	18
4. RESULTADOS.....	19
5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	21
6. ANEXOS.....	23
6.1. ENCUESTA.....	23
6.2. PLANILLAS ELISA.....	27
6.3. PROSPECTO KIT IDEXX NEOSPORA.....	32
6.4. FOTOS.....	35
7. BIBLIOGRAFÍA.....	37

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros de sistemas de producción de pequeños productores pertenecientes a la cuenca lechera Colonia Aurora en la provincia de Misiones, Argentina. La importancia de dicho trabajo radica en la escasa información de esta enfermedad en la región y en las características de dichos sistemas productivos que son diferentes a las principales cuencas lecheras del país.

La cuenca lechera estudiada está comprendida por los municipios de Alba Posse, 25 de Mayo y Colonia Aurora del departamento 25 de Mayo, El Soberbio y San Vicente del departamento Guaraní y San Pedro del departamento homónimo.

El trabajo se realizó con muestras de suero sanguíneo extraídas durante el viaje a Misiones en el marco de la materia de profundización "Pasantías a Campo" dictada por el grupo de sanidad en rumiantes de la UNRC.

Las tareas de análisis de laboratorio e interpretación se realizaron en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto y en el laboratorio LASA situado en la misma ciudad.

Se seleccionaron al azar 168 muestras de suero pertenecientes a 21 productores de la cuenca lechera Colonia Aurora. Las muestras fueron analizadas por la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum*. De los 21 rodeos estudiados en 18 (85,75%) había al menos un animal positivo. Del total de sueros analizados, 62 resultaron positivas a la infección por *N. caninum* siendo la prevalencia de 36,9%. Las prevalencias individuales de los diferentes rodeos estuvieron entre el 0% y el 100%. La prevalencia predial e intrapredial de *Neospora caninum* es importante por lo que debe considerarse esta enfermedad como potencial causante de problemas reproductivos en estos sistemas productivos.

OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

- ✓ Estudiar la seroprevalencia de neosporosis bovina en rodeos lecheros de pequeños productores de la cuenca lechera Colonia Aurora de la provincia de Misiones.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Procesar las muestras de suero mediante la técnica de ELISA para *N. caninum*.
- ✓ Analizar y evaluar los resultados obtenidos.
- ✓ Presentar la disposición geográfica de los casos positivos.
- ✓ Poder brindar información para la producción regional que era desconocida.

INTRODUCCIÓN

La Neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria provocada por el protozoo *Neospora caninum* (*N. caninum*), que tiene al perro como huésped definitivo, y al bovino y pequeños rumiantes como huéspedes intermediarios. En bovinos este agente puede causar abortos, muerte perinatal, terneros débiles con sintomatología nerviosa y una viabilidad de pocos días o nacen con una infección congénita y son asintomáticos (Dubey *et al.*, 1996; Echaide, 2000).

La principal vía de transmisión de la enfermedad y persistencia en el rodeo es la vertical transplacentaria. Se estima que entre el 80 y el 90% de las hijas de madres positivas nacen infectadas de manera vertical (Dubey *et al.*, 2006).

N. caninum es reconocida como agente causal de importantes pérdidas económicas en la industria de la carne y leche. Los eventos que pueden originar tales pérdidas son:

- Muerte fetal temprana con repetición de celo, incremento del intervalo parto concepción o infertilidad.
- Aborto en el tercio medio de la gestación.
- Muerte perinatal o neonatal.
- Incremento en el descarte de las vacas. Las vacas infectadas tienen más probabilidad de ser eliminadas por su bajo desempeño reproductivo.
- Reducida producción de leche.
- Reducido valor económico de la vaca para servicio. Las evidencias del mantenimiento de la infección a través de las generaciones hacen permanecer la infección en el rodeo reduciendo el valor de dichas hembras (Moore *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2007).

Ha sido descrita en regiones ganaderas de todo el mundo. En Argentina, la neosporosis tiene una amplia distribución, con seroprevalencias que varían del 4,7 al 88,8%; siendo los rodeos lecheros y con antecedentes de abortos los de mayor prevalencia (Lertora *et al.*, 2010). La enfermedad ha sido ampliamente demostrada en ganado bovino de la pampa húmeda. En el nordeste argentino la información es menor; en la provincia de Misiones existe información sobre la detección de *N. caninum* pero no hay estudios de seroprevalencia.

La región del este misionero también denominada Área Costera o Alto Uruguay, se ubica al este de la Ruta Nacional 14 que corre por el centro provincial y comprende los municipios de Alba Posse, 25 de Mayo, Colonia Aurora, San Vicente, El Soberbio y San Pedro (Chimicz 2013). Actualmente la región produce cerca de 15.000 litros de leche diarios y cuenta con 4 salas de elaboración: Cooperativa Esperanza Km7- (Cnia Aurora), Cooperativa Alto

Uruguay Lda. (Cnia Aurora), Cooperativa Sarandí (El Soberbio) y Comisión Vecinal Mojón (San Vicente), (Chimicz, 2013).

Este trabajo de investigación se desarrolla en la cuenca láctea de la localidad de Colonia Aurora, en la provincia de Misiones. La cuenca reúne a unos 250 pequeños tamberos, esencialmente productores familiares, que vuelcan la mayor parte de su materia prima en la producción de quesos. La cuenca incrementó su producción y ya es responsable de la generación de más de 400.000 litros de leche al mes. Estos productos tienen su espacio de comercialización directa del productor al consumidor en los más de 85 mercados comunitarios y ferias francas que funcionan en la provincia de Misiones (Supercampo Perfil.com, 2015).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

DEFINICIÓN

La neosporosis bovina es una enfermedad de distribución mundial causada por el protozoo intracelular *Neospora caninum*. Se caracteriza por producir abortos, momificación fetal, partos prematuros y nacimiento de terneros con ataxia, parálisis, incoordinación o débiles (Dubey, 1999; Dubey *et al.*, 2007).

Neospora caninum fue reconocido inicialmente en 1984 (Bjerkas *et al.*, 1984) en Noruega, tras describir un síndrome de encefalomiелitis y miositis en perros jóvenes. Por su similitud morfológica fue clasificado erróneamente como *Toxoplasma gondii* hasta que Dubey *et al.*, (1988) propuso la denominación actual como un nuevo género y especie: *N. caninum*. Posteriormente se aisló el agente en cultivo celular y se reprodujo la infección experimentalmente en el perro (Dubey *et al.*, 1988). El desarrollo de las pruebas serológicas [inmunofluorescencia indirecta (IFI)] y de la inmunohistoquímica (IHQ) permitieron mejorar la caracterización de la enfermedad (Bjerkas; Dubey, 1991).

TAXONOMÍA

Neospora caninum es un protozoo del phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoa*, subclase *Coccidia*, orden *Eucoccidia*, suborden *Eimeriina*, familia *Sarcocystidae* y género *Neospora* (Dubey *et al.*, 2003; 2007). Este agente está relacionado taxonómicamente a otros protozoos como *Haemmondia heydorni* e *Isospora bigemina* y tiene una estrecha relación taxonómica con los integrantes de la subfamilia *Toxoplasmatinae* como por ejemplo *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2002). *Neospora caninum* tiene un ciclo de vida heterogónico, habiéndose reconocido hasta el momento como hospedadores definitivos al perro (McAllister *et al.*, 1998), al coyote (Gondim *et al.*, 2004), al dingo australiano (King *et al.*, 2010) y al lobo gris (Dubey *et al.*, 2011 a). Un amplio rango de animales domésticos y salvajes pueden actuar como hospedadores intermediarios (Dubey; Lindsay, 1996). Pese al rango de hospedadores solo pudo ser aislada en forma viable de algunas pocas especies (bovinos, ovinos, búfalo de agua, perro, caballo, visón y ciervo de cola blanca) (Dubey; Schares, 2011 b).

CICLO DE VIDA

En su ciclo presenta tres estadios parasitarios: taquizoitos, bradizoitos y esporozoitos (contenidos en los ooquistes) (Dubey *et al.*, 2007). Los taquizoitos y bradizoitos son formas de proliferación asexual y se encuentran en los tejidos de un hospedador infectado (intermediario y definitivo). Mientras que los esporozoitos son el resultado de la división pos-cigótica que ocurre en el medio ambiente y se encuentran dentro de los ooquistes maduros o esporulados. Los ooquistes son excretados en las heces de los hospedadores definitivos inmaduros conteniendo solo una célula o cigoto (McAllister *et al.*, 1998).

Los taquizoitos son ovoideos, globulares o semilunares, miden de 5 a 7 μm de largo y 1 a 2 μm de ancho (Dubey; Lindsay, 1996 b; Hemphill *et al.*, 1999), poseen un núcleo central y carecen de gránulos de amilopectina (a diferencia de los bradizoitos) (Dubey *et al.*, 2006). Estos se dividen rápidamente dentro de las células y han sido detectados en neuronas, macrófagos alveolares, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células renales, hepatocitos y trofoblastos de placenta (Barr *et al.*, 1991 a; Dubey *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 2002). Los bradizoitos miden aproximadamente 6 a 8 μm de largo y 1 a 2 μm de ancho (Hemphill *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2002) y poseen un núcleo de localización terminal, a su vez contienen gránulos de amilopectina (Dubey *et al.*, 2006). Estos últimos tienen una replicación más lenta que los taquizoitos y pueden ser diferenciados de estos a través de IHQ (McAllister *et al.*, 1998). Los bradizoitos están contenidos en de quistes tisulares que a su vez se encuentran dentro de las células. La forma de los quistes tisulares es redonda u oval y miden hasta 107 μm , dependiendo del número de bradizoitos que contengan (Dubey *et al.*, 2002). Poseen, a su vez, una gruesa pared que protege al parásito de reacciones inmunológicas y físicas por parte del hospedador. A su vez, el espesor de la pared dependerá del tiempo de infección (Jardine, 1996). Los quistes tisulares han sido observados en el sistema nervioso central (SNC) y músculo esquelético de fetos y terneros (Peters *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2002) mientras que aún no se han observado estas formas en secciones histológicas en bovinos adultos naturalmente infectados.

Por último, los ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo son esféricos o subesféricos, miden 10 a 11 μm , no tienen color y en estado maduro o infectante contienen dos esporocistos con cuatro esporozoitos cada uno (McAllister *et al.*, 1998). Son excretados en un estado inmaduro y esporulan en 24-72 horas (Dubey *et al.*, 2007). El tiempo de sobrevivencia de los ooquistes en el medio ambiente no se conoce con exactitud. Se asume que el período de prepatencia en perros es de 5 días o más y permanecen como eliminadores durante un plazo de uno a varios días (Dubey *et al.*, 2007). La eliminación de ooquistes en materia fecal por parte de

un caninos naturalmente infectados (Basso *et al.*, 2001; Šlapeta *et al.*, 2002; McGarry *et al.*, 2003), puede ser infrecuente (Basso *et al.*, 2001), aunque en ocasiones se ha observado que esta eliminación puede ser por períodos prolongados (McGarry *et al.*, 2003).

Los tres estadios infecciosos de *N. caninum* (taquizoitos, bradizoitos y ooquistes con esporozoitos) están involucrados en la transmisión del parásito (Dubey *et al.*, 2007). Los cánidos que actúan como hospedadores definitivos pueden adquirir la infección a partir de la ingestión de tejidos que contengan quistes intracelulares. Hay evidencia que la ingestión de tejidos placentarios provenientes de vacas naturalmente infectadas puede ser una ruta de infección de importancia para los caninos. Al llegar al estómago, el quiste se mantiene intacto gracias a la resistencia de su pared a la acción de las enzimas y jugos gástricos, permitiendo que los bradizoitos sean liberados en la luz intestinal donde iniciarán el ciclo entero-epitelial (Dubey *et al.*, 1996). Luego de realizar un fase de reproducción asexual y sexual en el intestino, los ooquistes son eliminados en las heces del hospedador definitivo (Dubey *et al.*, 2007).

TRANSMISIÓN

En los bovinos existen dos vías de transmisión posibles de la enfermedad: la vía horizontal y la vía vertical (Anderson *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2006). En bovinos, *N. caninum*, se transmite en forma post-natal (transmisión horizontal) por consumo de agua o alimento contaminado con ooquistes esporulados. También puede provocarse, de manera muy eficiente, desde la madre al feto en forma transplacentaria (transmisión vertical). Esta última forma de transmisión contribuye significativamente a la persistencia de la enfermedad en el rodeo, ya que las vacas pueden quedar infectadas de por vida, propagando la infección a través de varias generaciones en forma consecutiva o intermitentemente (Boulton *et al.*, 1995; Guy *et al.*, 2001; Fioretti *et al.*, 2003; Pabón *et al.*, 2007). Diferentes estudios (Anderson *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2006; Moré *et al.*, 2009) han demostrado que la probabilidad de infección congénita varía desde el 40,7% al 95%.

Según su origen, la transmisión transplacentaria, puede ser exógena o endógena (Trees; Williams, 2005). La denominada exógena se refiere a las madres gestantes que sufren una primo-infección a partir de la ingestión de agua o alimento contaminados con ooquistes (transmisión horizontal), que van a estar expuestas al mismo tiempo y que pueden producir un brote de abortos epidémicos. La tasa de abortos va a depender de factores como la dosis infectiva ingerida, la patogenicidad de la cepa actuante y la susceptibilidad de las madres (McAllister *et al.*, 2000). En contraste, la reactivación de la infección latente en las madres

durante la gestación (transmisión transplacentaria endógena) puede ocasionar abortos, aunque en la mayoría de los casos nacen terneros congénitamente infectados sin signos clínicos (Paré *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2007). Este modo de transmisión es predominante y altamente eficiente ya que muchos establecimientos mantienen una tasa de prevalencia más o menos constante a lo largo de los años con una correlación casi perfecta entre la seropositividad de las madres y sus terneros, sin que exista una aparente fuente externa de infección. Por otro lado, la tasa de infección transplacentaria endógena puede disminuir en preñeces subsecuentes, indicando el desarrollo de inmunidad (Dubey *et al.*, 2007).

La transmisión horizontal, responsable de los casos de transmisión transplacentaria exógena, se estima que es menos frecuente. La única forma natural de infección es por la ingestión post-natal de ooquistes esporulados por parte del ganado (De Marez *et al.*, 1999). La infección latente puede ser adquirida vertical u horizontalmente y el mecanismo de reactivación del parásito no es conocido.

En bovinos y otros rumiantes, debido al tipo de placenta (sindesmocorial), no hay transferencia de anticuerpos de la madre al feto durante la gestación. Por lo tanto, la detección de anticuerpos séricos específicos en el feto o el ternero antes de la ingesta de calostro indica contacto con *N. caninum* y síntesis de anticuerpos fetales. Aunque existe la posibilidad que ante diferentes circunstancias de infección los anticuerpos estén ausentes en el feto, por ejemplo, infecciones previas a la inmunocompetencia fetal alrededor de los 120 días de gestación que ocasionen un cuadro de inmunotolerancia (Yao *et al.*, 2009).

La determinación de la principal ruta de infección es un factor para considerar a la hora de establecer medidas preventivas y de control (Moré *et al.*, 2009). La transmisión horizontal en el ganado vacuno se caracteriza por la ausencia de relación en el título de anticuerpos entre madre e hija, por la seroconversión o presencia de anticuerpos en animales previamente negativos a *N. caninum* y/o por la presentación de episodios de abortos relacionados con el parásito (Dijkstra *et al.*, 2001; 2002, 2003). En rodeos donde la transmisión vertical es la predominante, es posible observar que los animales positivos se agrupan en ciertas familias (Scharés *et al.*, 1998) en el que la transmisión puede alcanzar hasta 95% (Davison *et al.*, 1999), donde las vacas infectadas presentan elevadas proporciones de transmisión transplacentaria (López-Gatius *et al.*, 2004).

FACORES DE RIESGO DE INFECCIÓN

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 precalostrales 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). Este evento es explicable por la existencia de una transmisión congénita reciente, junto con la reactivación de infecciones latentes durante la gestación y el paso de anticuerpos calostrales de la madre al ternero (Quintanilla-Gozaño *et al.*, 2000). A su vez los terneros y vaquillonas, de 7 a 12 meses de edad, presentan títulos inferiores a las categorías adultas (Pereira-Bueno *et al.*, 2000). A su vez se ha observado en esta última categoría que los títulos se incrementan a los 25 meses de edad, en aquellos animales que presentan infección congénita (Hietala; Thurmond, 1999), compatibles con estímulos antigénicos al comienzo de la etapa reproductora.

Sistema de producción: la neosporosis bovina afecta tanto rodeos de cría como lecheros con mayor prevalencia en los últimos (Quintanilla-Gozaño *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Moore, *et al.*, 2002). Este podría estar relacionado con el tipo de manejo del ganado y no con una predisposición racial tal como se ha señalado (Thornton *et al.*, 1991; Paré *et al.*, 1997). 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, agua, cama, etc.) facilitando las posibilidades de contagio (Dijkstra *et al.*, 2002).

Tamaño del rodeo: Barling *et al.* (2001) demostraron que la seropositividad aumenta a medida que se incrementa la densidad animal. Esto podría deberse a un incremento en la probabilidad de la transmisión horizontal en los rodeos a partir de una fuente puntual de exposición a ooquistes infectantes, lo que probablemente explica, como se mencionó anteriormente, la mayor incidencia en rodeos para leche (Otranto *et al.*, 2003).

Presencia de hospedadores definitivos e intermediarios: con algunas excepciones (Barling *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2004), estudios previos han identificado a los perros, que se encuentran asociados a los rodeos, como un factor de riesgo de infección por *N. caninum*, (Paré *et al.*, 1997; Ould-Amrouche *et al.*, 1999; Schares *et al.*, 2003) y aborto relacionado a este agente (Bartels *et al.*, 1999). A su vez, existe una relación directa entre el tamaño del rodeo y la

seroprevalencia asociado al número de caninos presentes en el establecimiento (Otranto *et al.*, 2003; Schares *et al.*, 2004). 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; Corbellini *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007). Además, existe asociación positiva entre la abundancia de cánidos silvestres y la seropositividad de los bovinos. Se ha observado una relación entre la seroprevalencia en el ganado bovino y la abundancia de zorros y coyotes (Barling *et al.*, 2000). A su vez la presencia de otros hospedadores intermediarios también sería un factor de riesgo. Un estudio (Dubey *et al.*, 2007) demostró la presencia de ADN de *N. caninum* en ratas y ratones infectados naturalmente sugiriendo que estos animales podrían ser una importante fuente de infección para carnívoros. Se ha descrito una mayor seroprevalencia en perros de granja frente a los de zonas urbanas y una asociación significativa entre la presencia de perros en las granjas y el porcentaje de vacas seropositivas (Bartels *et al.*, 1999; Wouda *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2003).

Reposición de vientres: en los rodeos seronegativos existe un mayor riesgo de infección cuando se utilizan para reposición vaquillonas de compra (Scharés *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).

Clima: las condiciones climáticas tienen efecto sobre la esporulación de los ooquistes y sobrevida 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).

Manejo nutricional: las diferentes prácticas de manejo nutricional, como el traslado de los rodeos 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 para rollos podría incrementar la población de hospedadores intermediarios, como roedores, constituyendo una posible fuente de infección para los hospedadores definitivos (Dubey *et al.*, 2007).

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).

PATOGENIA

La neosporosis bovina tiene una patogenia compleja en la que influyen múltiples factores dependientes del medio ambiente, hospedador y del parásito. Se trata principalmente de una enfermedad de la placenta y del feto, iniciada tras una parasitemia, ya sea como resultado de una infección materna primaria (exógena) o por la recrudescencia durante la gestación de una infección persistente (endógena). (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2002). Tras la ingestión de ooquistes esporulados (transmisión transplacentaria exógena) (de Marez *et al.*, 1999; Gondim *et al.*, 2004), los esporozoítos son liberados en el intestino delgado, parasitan el epitelio y se transforman en taquizoitos. Estas formas son las responsables de la fase aguda de la infección e iniciarán una etapa de multiplicación rápida en los linfonódulos mesentéricos para luego ser liberados al torrente circulatorio y de esta forma, alcanzar diferentes tejidos (Dubey *et al.*, 2006). El resultado de la parasitemia es la diseminación por diferentes tejidos, inclusive útero grávido. Luego se multiplican intracelularmente por endodiogenia, (Dubey; Lindsay, 1996). La severidad de la infección dependerá de la capacidad del taquizoíto para penetrar y multiplicarse en las células y la habilidad del hospedador para inhibir la proliferación del parásito. La multiplicación intracelular del parásito causa la destrucción tisular. Como consecuencia de estos focos de necrosis, se produce además una reacción inflamatoria con células mononucleares (Buxton *et al.*, 2002).

Con el comienzo del desarrollo de la respuesta inmune del hospedador, los taquizoitos se diferencian en bradizoitos dentro de los quistes tisulares ocasionando una infección persistente (Buxton *et al.*, 2002).

Durante la fase crónica de la infección los quistes tisulares con bradizoitos no ocasionan una acción patógena destacada, por lo que el animal no manifiesta ninguna signología. Sin embargo, los bradizoitos alojados en los quistes tisulares del SNC en una hembra gestante pueden reactivarse bajo ciertas influencias hormonales e inmunológicas y transmitir la infección al feto (transmisión transplacentaria endógena). Esta forma de transmisión sería el modo de transmisión más común en bovinos (Anderson *et al.*, 1997). En estos casos, los bradizoitos se liberarían de los quistes transformándose en taquizoitos originando una nueva fase aguda de infección (Quinn *et al.*, 2002). Las causas que provocan la muerte del feto parecen ser multifactoriales y no se conocen con detalle. Dubey y Porterfield (1990) señalaron que la muerte del feto podría ser debida a una miocarditis. Sin embargo, otros autores han postulado que las lesiones en el SNC serían las principales responsables (Barr *et al.*, 1994). Aun así, en muchas ocasiones no se han encontrado graves lesiones en los órganos vitales por lo que la muerte del

feto parece depender también de otros factores. En este sentido, se ha sugerido la importancia de la respuesta inmune celular desarrollada por las hembras gestantes, principalmente durante el periodo inicial de gestación. En la gestación se produce un estado de inmunodepresión concretamente en la placenta, con el fin de evitar el rechazo del feto. Las citoquinas pro-inflamatorias del tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α) que podrían provocar el rechazo del feto están inhibidas y predominan las de tipo Th2 como la IL-10 o el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β). Esta situación beneficiaría la multiplicación del parásito y facilita la destrucción focal de la placenta, tanto materna como fetal, así como el desarrollo de una respuesta inflamatoria. En consecuencia de la multiplicación del parásito se desencadenaría una respuesta Th1 en la madre para controlar la replicación del patógeno, la cual puede ser letal para el feto (Buxton *et al.* 2002; Innes *et. al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2002). Asimismo, se ha sugerido que la muerte fetal podría producirse directamente por la invasión del placentoma por el parásito y el consiguiente daño tisular, interrumpiéndose de esta forma el intercambio de oxígeno y nutrientes.

A su vez resultados obtenidos tanto en infecciones naturales como experimentales, han demostrado que la edad gestacional determina el desenlace de la infección. En investigaciones realizadas en vacas con infección natural, Dannatt (1997) y Paré *et al.*, (1997) describieron un aumento en el título de anticuerpos en los meses 5, 6 y 7 de gestación que podría estar relacionado con un mayor estímulo antigénico procedente de la multiplicación del parásito en el feto. Por su parte, Quintanilla-Gozalo *et al.*, (2000) y Pereira-Bueno *et al.*, (2000) estudiaron las fluctuaciones de anticuerpos durante la gestación en 32 vacas seropositivas, de las cuales sólo abortaron 10. Se observó un incremento en el título de anticuerpos durante el segundo trimestre, más acusado en las vacas que abortaron y durante el tercer tercio en las vacas que tuvieron terneros congénitamente infectados.

Los resultados obtenidos en infecciones experimentales han demostrado que en función del periodo de gestación en el que se realice la inoculación del parásito, puede producirse la muerte fetal, el nacimiento de terneros con transmisión congénita o bien el de terneros no infectados. El efecto de la infección antes del comienzo de la gestación ha sido poco estudiado y parece dar lugar al nacimiento de terneros no infectados (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001). Sin embargo la infección durante la primera fase de la gestación suele producir la muerte fetal (Barr *et al.*, 1994a; Williams *et al.*, 2000). La inoculación de taquizoitos en el segundo tercio de gestación tiene consecuencias variables, produciéndose, en la mayoría de los casos, la infección del feto y no su muerte (Barr *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 2001; Almería *et al.*, 2003; Maley *et al.*, 2003). La inoculación en el último tercio ha dado lugar al nacimiento de terneros congénitamente infectados (Williams *et al.*, 2000).

SIGNOS CLÍNICOS

Neospora caninum es la mayor causa de fallas reproductivas en rodeos para carne y leche de diversos países, provocando severas pérdidas económicas (Trees *et al.*, 1999). La infección del feto puede ocasionar: reabsorción, momificación, aborto, nacimiento prematuro y muerte perinatal. Sin embargo, en la mayoría de los casos se produce el nacimiento de un ternero clínicamente sano pero persistentemente infectado. Rara vez, los terneros congénitamente infectados pueden manifestar signología nerviosa variando desde una leve ataxia a tetraparálisis (Moskwa *et al.*, 2007). Las extremidades posteriores y anteriores pueden presentarse flexionadas o hiperextendidas y al examen neurológico puede observarse disminución del reflejo patelar y de la propiocepción (Dubey *et al.*, 2006). Ocasionalmente, pueden producirse defectos congénitos como escoliosis, hidrocefalia o estrechamiento del cordón espinal (O'Toole; Jeffrey, 1987; Barr *et al.*, 1991a; Dubey; Lindsay, 1996).

En cuanto al aborto es la principal manifestación clínica de la neosporosis bovina. La mayor cantidad de abortos ocurren durante la mitad de la gestación. Los fetos que mueren en el útero entre el 3er y el 8vo mes de gestación son usualmente expulsados mostrando moderado grado de autólisis, pero aquellos fetos que mueren antes del 5to mes de gestación pueden momificarse y ser retenidos en el útero por varios meses. Cuando la muerte ocurre en los primeros meses de gestación, puede ocurrir la reabsorción seguida de un nuevo celo (Barr *et al.*, 1991b; Dubey, 2003). Los abortos pueden presentarse en forma endémica o epidémica. En los rodeos con infección endémica se pueden registrar hasta un 10% de abortos que ocurren de un modo esporádico. Mientras que los abortos son definidos como epidémicos si más del 10% o 12,5% de las vacas en riesgo abortan dentro de 6 a 8 semanas (Wouda *et al.*, 1999).

DIAGNÓSTICO

Numerosas técnicas son confiables para investigar la infección por *N. caninum* en casos de aborto bovino. Arribar a un diagnóstico confiable de un aborto bovino por *N. caninum* o el rol de la infección en todo el rodeo, puede ser obtenido principalmente examinando fetos abortados y complementariamente por el análisis de anticuerpos del parásito en las madres y sus crías. Para confirmar la situación en un rodeo con relaciona a abortos debidos a *N. caninum* será por lo tanto necesario aplicar una combinación de técnicas de diagnóstico (Ortega-Mora *et al.*, 2007). Los tejidos fetales pueden ser examinados histológicamente o el parásito puede ser detectado en

forma específica a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por IHQ. La histología detecta lesiones causadas por la infección *N. caninum* en cerebro, corazón e hígado. Estas lesiones son características de infecciones causadas por un protozoo (Wouda *et al.*, 1997). A su vez, existen técnicas específicas que pongan en evidencia la presencia del parásito, como la IHQ y la PCR.

La comparación de técnicas de detección directa para el diagnóstico de *N. caninum* reveló que la sensibilidad de la IHQ tiene limitaciones y se consideró a la PCR como la técnica de diagnóstico de elección para detectar la presencia del parásito (Van Maanen *et al.*, 2004). Esto podría ser importante a la hora del diagnóstico, sin embargo, establecer el diagnóstico de aborto por *N. caninum* es complejo debido a que las infecciones congénitas asintomáticas son habituales y determinar la presencia del parásito o su ADN no implica que el aborto haya sido ocasionado por el protozoo. Por lo tanto es necesario el criterio de un patólogo para poder arribar a un diagnóstico final (Ortega-Mora *et al.*, 2007). Técnicas de cultivo celular e inoculaciones en animales de experimentación pueden ser utilizadas para aislamiento de *N. caninum* y así poder lograr una mayor multiplicación y caracterización del agente. Pero estos métodos son principalmente utilizados para estudios de investigación y no como técnicas de diagnóstico. Técnicas serológicas, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el inmunoblot, pueden también ser usados para obtener evidencia de la infección por *N. caninum* en fetos abortados para detección de anticuerpos específicos en fluidos fetales. Sin embargo, la detección de anticuerpos está íntimamente relacionada con la edad del feto, ya que en fetos que se encuentran más cercanos al término de la gestación la probabilidad es mucho mayor que en fetos jóvenes (Ortega-Mora *et al.*, 2007). A nivel de rodeo la infección por *N. caninum* puede ponerse en evidencia a través de la detección de anticuerpos anti- *N. caninum* en el suero o la leche de vacas infectadas. Así como también mediante la utilización de técnicas directas como PCR en sangre y semen (Caetano- da- Silva *et al.*, 2004; Okeoma *et al.*, 2004; Ferre *et al.*, 2005), estas técnicas no son realizadas en forma rutinaria debido a la intermitente presencia del parásito en sangre (Ferre *et al.*, 2005).

Por otra parte, técnicas como IFI, microaglutinación, inmunoblot y un considerable número de ELISAs 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 *N. caninum*. Un número de ELISAs han sido también modificados para estudios de avidéz de los anticuerpos encontrados en animales infectados (Maley *et al.*, 2001; Schares *et al.*, 2002). 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). El diagnóstico presuntivo de neosporosis en fetos puede considerarse por la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en líquido de cavidades y por las lesiones histológicas. La IHQ usando anticuerpos contra *N. caninum*, es un método efectivo para confirmar la presencia del parásito asociado a las lesiones histopatológicas o la presencia de quistes tisulares (Anderson *et al.*, 2000).

PRUEBAS SEROLÓGICAS:

Diversas pruebas serológicas tales como IFI (Dubey *et al.*, 1988), el ELISA (Dubey *et al.*, 1997), la microaglutinación (Romand *et al.*, 1998) y la APIA (Wilkowsky *et al.*, 2011) han sido utilizadas para demostrar anticuerpos en el suero, leche o en el fluido corporal de los fetos. Para la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum* una amplia variedad de antígenos inmunoreactivos han sido descritos. Han sido reconocidas por lo menos 20 proteínas de taquizoitos en el rango de los 16 a 80 Kda en westernblots, usando anticuerpos policlonales. Los antígenos inmunodominantes fueron detectados como un grupo comprendiendo moléculas con un peso de 16/17, 29/30, 37 y 46 Kda. Los antígenos de 29/30 y 37 Kda son los que se detectan con mayor consistencia por lo que se reconocen como los más importantes para ser utilizados en las pruebas serológicas (Barta *et al.*, 1992; Bjerkas *et al.*, 1994).

Los niveles de anticuerpos suelen mantenerse altos durante la gestación en vacas naturalmente infectadas (Jenkins *et al.*, 1997; Stenlund *et al.*, 1999). Sin embargo, en un estudio realizado en Gran Bretaña (Dannatt, 1997) registraron que el 25% de 40 vacas gestantes naturalmente infectadas tuvieron al menos un momento a lo largo de 12 meses que el nivel de anticuerpos estuvo por debajo del límite de detección. Stenlund *et al.*, (1999) ha descrito un aumento del título de anticuerpos en vacas naturalmente infectadas durante 4-5 meses antes del parto y subsecuentemente una caída a los 2 meses posterior al mismo, coincidiendo con otros estudios que describen un aumento similar durante el segundo tercio de gestación (Dannatt, 1997). A su vez también se ha observado (Quintanilla, Gozalo *et al.*, 2000) que el nivel de anticuerpos es significativamente más elevado durante el segundo tercio de gestación en vacas que abortan en comparación con no abortadas, sugiriendo que el aumento en la concentración de anticuerpos no sería un factor de protección contra el aborto. Varios estudios sugieren que el aumento de la concentración de estradiol suprime la inmunidad mediada por las células y aumenta la formación de anticuerpos sistémicos a los agentes infecciosos (Styrt; Sugarman,

1991). Por lo tanto, algunos autores sugieren (Stenlund *et al.*, 1999) que el mayor título de anticuerpos durante la gestación podría reflejar una mayor liberación de parásitos por parte de las células de vacas crónicamente infectadas debido una inmunosupresión hormonal.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI): La prueba de IFI utiliza taquizoitos intactos como antígenos detectando principalmente anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes sobre la superficie del parásito (Björkman *et al.*, 1997) existiendo muy poca reacción cruzada con otros protozoos (*Sarcocystis* spp) (Dubey *et al.*, 1996). A su vez es la prueba de referencia para la estandarización de otras pruebas (Björkman *et al.*, 1997). Para diluciones séricas de 1:25 a 1:640 la sensibilidad y especificidad de la prueba varía de 82.4% a 97% y 85.7% a 90%, respectivamente.

Enzimoinmunoensayo (ELISA): Este método ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la neosporosis. La facilidad para procesar un gran número de muestras, una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con la IFI, sumado a la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, hacen confiable esta prueba (Paré *et al.*, 1997). El título de corte o el valor de absorbancia asignado a una prueba es motivo de controversia ya que depende de factores tales como composición del antígeno, anticuerpos identificados y de los conjugados utilizados (Dubey *et al.*, 1997). Un determinado título o valor de corte debería ajustarse a cada circunstancia o situación epidemiológica (Dubey *et al.*, 1999).

ELISA de avidéz: La presencia de anticuerpos a *N. caninum* en el suero indica que un individuo está infectado por el parásito. A su vez, los anticuerpos pueden persistir por largos períodos de tiempo y presentar fluctuaciones a lo largo del tiempo (Jenkins *et al.*, 1997; Stenlund *et al.*, 1999; Sager *et al.*, 2001). Sin embargo los niveles de anticuerpos o el aumento de los títulos no pueden ser usados para estimar si un individuo sufre de neosporosis aguda o crónica. Una de las formas para la identificación de infecciones recientes es midiendo la avidéz que tienen los anticuerpos para unirse con antígenos específicos de *N. caninum*. Esta avidéz es inicialmente limitada pero se incrementa lentamente a medida que transcurren las semanas permitiendo distinguir infecciones recientes de infecciones preexistentes, pasadas o viejas.

La prueba de avidéz está basada en el hecho de que el agregado de urea durante el desarrollo del ELISA disocia las uniones débiles de los anticuerpos mientras que los anticuerpos con alta avidéz permanecen firmemente acoplados al antígeno. De esta forma, la prueba permite

distinguir infecciones primarias o recientes (con pobre unión Ag-Ac) de las infecciones preexistentes (con fuertes uniones Ag-Ac).

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. 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 que no se ha utilizado como un método habitual de diagnóstico sino como técnica confirmatoria de otras pruebas serológicas (Atkinson *et al.*, 2000; Söndgen *et al.*, 2001).

Prueba de aglutinación: Esta prueba es muy útil porque no requiere anticuerpos secundarios conjugados, equipamiento para ELISA o microscopio para inmunofluorescencia. Packham *et al.* (1998) desarrollaron un test de aglutinación el cual fue comparado con IFI y ELISA. La prueba de aglutinación dio una mayor sensibilidad y especificidad que la prueba de ELISA y tuvo una mayor sensibilidad pero menor especificidad que la IFI.

CONTROL

La eliminación del parásito en el bovino infectado a través de la quimioterapia o de la propia respuesta inmune post-infección, se ve dificultada por la habilidad que tiene *N. caninum* para formar quistes en el tejido nervioso, lo cual le da protección y le permite persistir por tiempo indefinido.

Los quimioterápicos que son efectivos *in vitro* o parcialmente efectivos en la especie canina, no serían útiles para bovinos con quistes y agregarían el riesgo de contaminar la leche con residuos químicos.

El uso de vacunas permitiría disminuir la ocurrencia de abortos aunque difícilmente logre eliminar las infecciones persistentes a causa de los quistes mencionados. Actualmente se trabaja intensamente en la evaluación de antígenos y adyuvantes para tener una vacuna a mediano plazo. La efectividad de estas potenciales vacunas, deberá ser evaluada antes de su uso

masivo, particularmente si las cepas no son origen nacional y se desconoce el grado de protección que es capaz de generar en los bovinos locales. El uso de una vacuna en forma no planificada e irracional, podría dificultar la detección serológica de los animales infectados, lo que entorpecería el control en rodeos con baja prevalencia.

La ausencia de perros en el establecimiento es una de las medidas preventivas necesaria para evitar la transmisión horizontal. La destrucción sistemática de fetos abortados, placentas o terneros muertos, evitará que otros potenciales hospedadores sirvan de fuente para la infección. Asimismo sería útil el aislamiento de las vacas que aborten, mientras tengan descargas uterinas. La importancia de la higiene post-aborto, se basa en que se han encontrado taquizoitos en la placenta de vacas abortadas y por otro lado se ha demostrado que se pueden infectar terneros suministrando taquizoitos por vía oral.

La reposición de vientres debe realizarse con vacas o vaquillonas no infectadas (propias o compradas), preferentemente hijas de vacas no reactivas. A su vez, deberán eliminarse progresivamente las vacas reactivas positivas.

MATERIALES Y MÉTODOS

CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTORES DE LA CUENCA LECHERA

Los productores con los cuales se realizó el trabajo de investigación, pertenecen a la cuenca lechera del Alto Uruguay, son productores de tipo familiar, que tienen una superficie de tierra de entre 5 y 15 hectáreas en promedio, sobre las cuales realizan una diversificada producción agrícola y ganadera entre las que se incluyen tabaco, te, yerba mate, cerdos, aves de corral y bovinos de razas lecheras. Todas estas producciones son a pequeña escala con muy baja tecnificación y asesoramiento externo. Dentro de la chacra se encuentra la vivienda familiar, esto es uno de los factores por los cuales es muy común la presencia de perros en la chacra, ayudando así a la presencia y transmisión de la enfermedad en el rodeo bovino.

En estos sistemas productivos no se llevan registros de producción de ningún tipo y los animales no son identificados con caravanas, marca o señal.

En lo que respecta al ganado lechero sobre el cual se realiza el muestreo son en promedio entre 8 y 10 animales por rodeo, de distintas razas donde predominan las cruzas de cebú y cruzas de holando.

La reposición de los animales se hace solo por muerte de los mismos y lo hacen con las crías de las propias vacas o reponen con animales de algún vecino cercano, otro de los factores que ayudaría a la presencia de *N. caninum* en el rodeo de forma endémica.

MUESTREO

En agosto del 2015 en el marco de la pasantía anual que realizan estudiantes que cursan la materia "Pasantías a campo", se muestrearon a 103 establecimientos de pequeños productores familiares de la provincia de Misiones. Todos estos productores pertenecen a la cuenca lechera Colonia Aurora (Imagen 1). En estos establecimientos se muestreó a todas las vacas en lactancia las cuales fueron 1022.

Del total de los 103 establecimientos muestreados se seleccionó al azar 21 con 168 animales muestreados. En la tabla 3 se observa la distribución de los establecimientos seleccionados en los departamentos y el número de animales muestreados.

A las muestras de sangre extraídas se les separó el suero, éstos fueron congelados a -20 °C hasta su procesamiento, 30 días después de la recolección.

Se conto con información del productor y de los animales obtenida de encuestas realizadas junto con el muestreo, las mismas incluían datos de identificación del productor, identificación de los animales, categoría, raza y sexo.

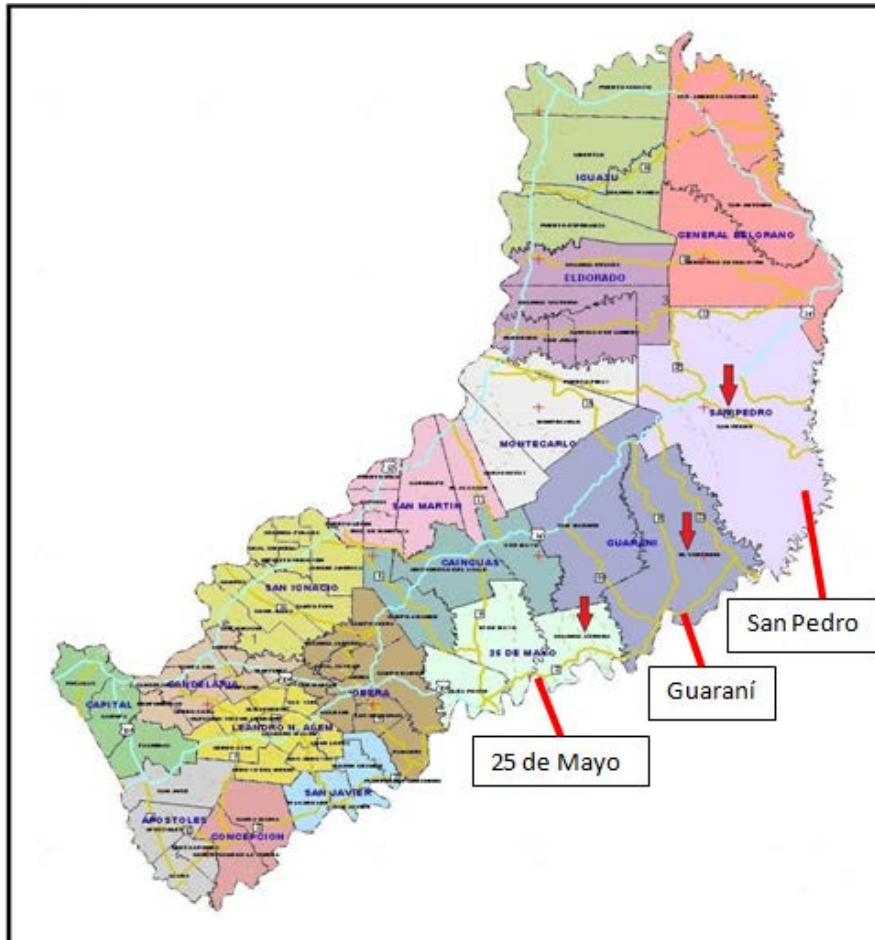


Imagen 1: Departamentos muestreados de la provincia de Misiones.

ANÁLISIS DE LABORATORIO

El análisis de las muestras se realizó en el Laboratorio de Salud Animal (LASA) en la ciudad de Río Cuarto, Córdoba.

El análisis se efectuó mediante la técnica de ELISA. El kit utilizado es *IDEXX Neospora* de *IDEXX Laboratories, Inc.*

Una vez realizado el procesamiento de las muestras se analizaron los resultados clasificándolas como positivas, dudosas o negativas a *Neospora caninum*.

RESULTADOS

Seroprevalencia a *Neospora caninum* en vacas

De los 168 sueros analizados por la técnica de ELISA para *N. caninum*, 62 (36.9%) fueron seropositivos. De los 21 rodeos comprometidos en el estudio 18 (85.7%) tenían al menos un animal seropositivo.

Nº rodeos muestreados	Rodeos con al menos 1 animal positivo	Porcentaje de rodeos positivos
21	18	85,7 %

Tabla 1: Prevalencia de rodeos positivos a *N. caninum*.

Nº animales muestreados	Animales positivos	Seroprevalencia
168	62	36,9 %

Tabla 2: Prevalencia de animales positivos a *N. caninum*.

La seroprevalencia en los rodeos seropositivos varía desde el 16.7% al 100%. Los resultados indican que 13 (72,2%) de los rodeos seropositivos tienen como mínimo un tercio de su rodeo infectado con *N. caninum* (Gráfico 2).

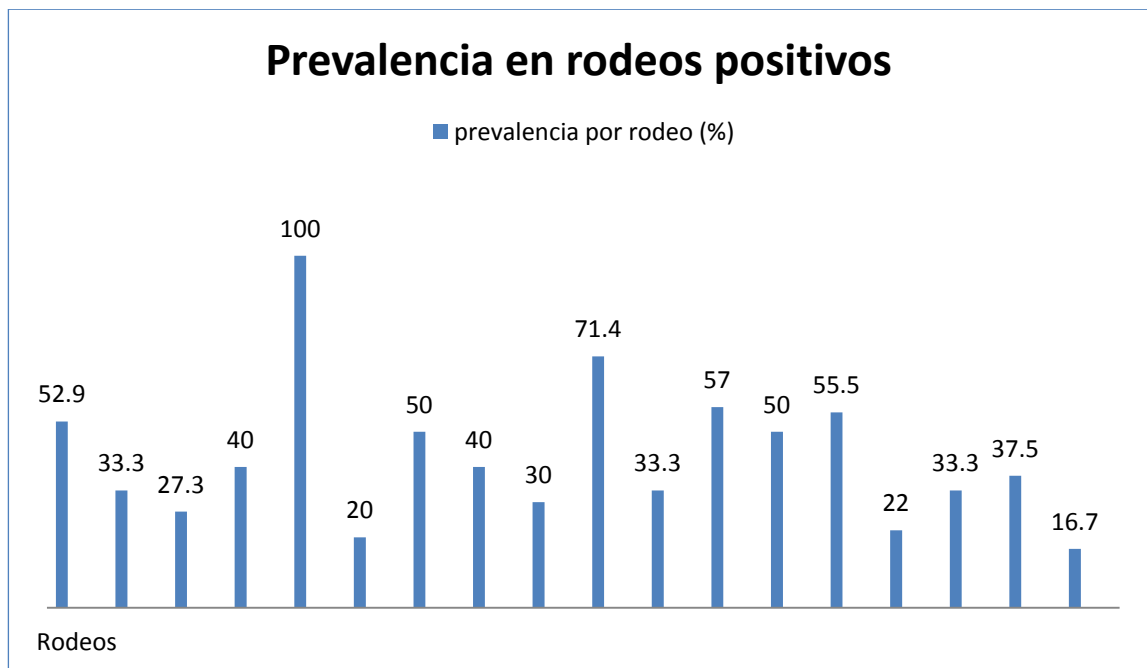


Gráfico 1: Prevalencias (%) de *N. caninum* en los rodeos positivos.

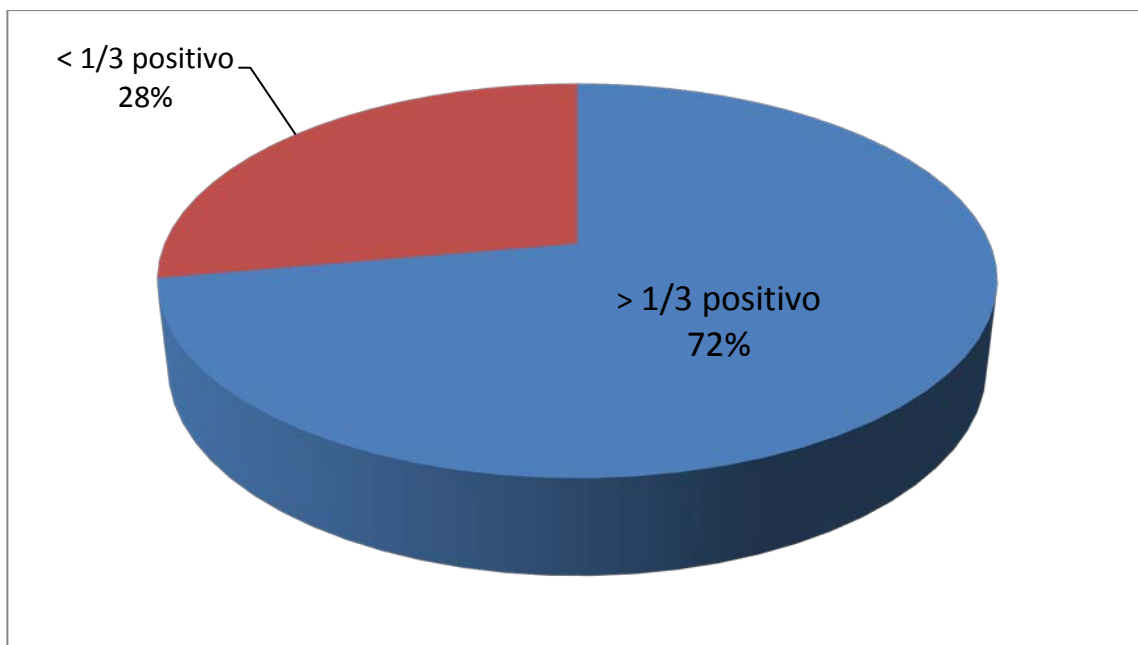


Gráfico 2: Porcentajes de establecimientos positivos con al menos un tercio de animales positivos.

Los resultados indican que de los 18 establecimientos seropositivos, el 50% (9) están en el departamento 25 de Mayo, 33,3% (6) en el departamento Guaraní y 16,7% (3) en el departamento San Pedro.

Al agrupar los resultados obtenidos por departamento la seroprevalencia de vacas positivas a *N. caninum* dentro de cada departamento fue del 36,5% en el departamento 25 de Mayo, 39,3% en el departamento Guaraní y 31,6% en el departamento San Pedro (Tabla 4).

Departamento	Nº Establec. muestreados	Nº Establec. positivos	Prevalencia
25 de Mayo	11	9	81.8 %
Guaraní	6	6	100 %
San Pedro	4	3	75 %

Tabla 3: Prevalencia de establecimientos positivos en cada departamento.

Departamento	Nº animales muestreados	Nº animales positivos	Prevalencia
25 de Mayo	93	34	36,5 %
Guaraní	56	22	39,5 %
San Pedro	19	6	31,6 %

Tabla 4: Prevalencia de animales positivos a *N. caninum* en cada departamento.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados indican una importante presencia de *Neospora caninum* en los rodeos bovinos de leche en la cuenca lechera Colonia Aurora, encontrándose en el 87.5% de los rodeos analizados y con un porcentaje dentro de ellos de hasta el 80% de los animales infectados.

Si bien la cantidad de pequeños productores que entregan su producción a las cooperativas de la cuenca lechera Colonia Aurora sería de 129 con un total de más de 1257 animales en ordeño según las encuestas realizadas en relevamientos productivo-sanitario, con los datos obtenidos podemos estimar que *Neospora caninum* se encuentra presente en la mayoría de los rodeos de la región.

Marcelo Fort en un estudio seroepidemiológico realizado en La Pampa en el año 2001 arrojó que el 100% de los tambos estudiados fueron positivos a *N. caninum* con una prevalencia en vacas del 20,3%, resultados similares a los obtenidos en Misiones.

Se puede remarcar como factor de riesgo de infección de *N. caninum* la presencia de gran cantidad de perros en las chacras y su estrecho contacto con los animales y las instalaciones utilizadas en la producción lechera como son los comederos y bebederos, lugares de ordeño y lugares de depósito de alimentos (Relevamiento productivo-sanitario). Otro factor de riesgo muy importante es que todas las vaquillonas nacidas en la chacra se utilizan para la reposición, quedó demostrado en diferentes estudios que la probabilidad de transmisión vertical transplacentaria varía entre el 40,7 y 95% (Anderson *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2006; Moré *et al.*, 2009), siendo estos terneros congénitamente infectados sin signos clínicos los encargados de mantener la infección por varias generaciones dentro del rodeo (Barling *et al.*, 2001; Otranto *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2007).

El aborto, principal signo clínico de la enfermedad se puede registrar hasta en un 10% en rodeos donde se mantiene una infección endémica y van a ocurrir de manera esporádica. Esta característica favorecería a que no se detecten los abortos y por lo tanto no se diagnostique la enfermedad ni se tomen medidas preventivas, esto sumado a que los productores no llevan registros reproductivos ni de la producción, por lo que se hace difícil detectar problemas reproductivos como abortos o repeticiones de celo. Asimismo puede que la poca aparición de abortos se deba a la cepa actuante, a la poca exigencia de producción sobre los animales y al tamaño de los rodeos.

Pese al diagnóstico del agente en los animales, la falta de conocimiento por parte de los productores y el escaso asesoramiento profesional que poseen y la falta de herramientas para su control y erradicación son factores importantes que sumados a los anteriormente citados van a

actuar en conjunto permitiendo la persistencia del parasito en los rodeos con las pérdidas en la producción que este produce y la consecuente pérdida económica.

ANEXOS

Figura 1: Modelo de encuesta realizada a los productores.

RELEVAMIENTO PRODUCTIVO SANITARIO					
<u>AÑO:</u>					
<u>GRUPO:</u>					
<u>PRODUCTOR:</u>					
		Bovinos Totales: Vacas: Vaquillonas: Toros: Novillos: Terneras:			
Nombre del Productor: (letra clara).....					
1- SUPERFICIE Y TENENCIA DE LA TIERRA					
	Propias	No propias	Potrero	Monte	Agrícola
Cantidad de hectáreas					
2-CUANDO INCORPORA BOVINOS, LOS TRAE DE: Productores similares a usted.....					
Productores más grandes.....					
De qué zona:.....					
No incorpora.....					
3-FAENA PROPIA (completar con cruces)					
	Bovinos	Cerdos	Ovinos		
Faenan					
Encuentran granos con contenido parecido a ricota					
4- ¿HA TENIDO MALOS PARTOS O ABORTOS EN VACAS?					
NO..... SI..... ¿Cuándo?.....					
¿Qué hacen con el aborto?					
Entierran.....Queman.....Se lo dan a los perros.....Tiran en un pozo o al monte.....					
¿Tienen perros? NO.... SI.... ¿Cuántos?.....					

Figura 2: Modelo de encuesta realizada a los productores.

5- ¿LE SUMINISTRA ALGÚN TIPO DE ALIMENTO A SUS VACAS EN COMEDEROS?
NO.....
SI..... ¿El comedero es compartido por varios bovinos? SI..... NO.....

6- ¿DE DONDE TOMAN AGUA SUS ANIMALES?
Bebadero.....Laguna.....Arroyo.....otro.....
¿Beben en el mismo lugar que los animales de otros productores? Si..... No.....

7- ¿COMPARTE POTREROS DE PASTOREO E INSTALACIONES CON ALGÚN VECINO QUE TENGA VACAS? NO..... SI.....

8- ¿TUVO O TIENE MASTITIS CLINICA? (EN LOS ÚLTIMOS 2 AÑOS)
NO....
SI... En qué época es más común?.....Cómo ve la leche.....
a. ¿Qué tratamiento de mastitis hace de rutina?
.....
b. ¿Usa antibióticos al secado en todos los cuartos? NO..... SI..... (Anotar tipo de antibiótico usado)

9-¿SU FAMILIA CONSUME LECHE DE SU PROPIA PRODUCCIÓN?
NO....
SI.... Cruda.....Hervida.....Ambas.....

10-PARA LA ELABORACIÓN DE QUESO, RICOTA, MANTECA, CREMA, ETC. ¿PASTEURIZAN O HIERVEN LA LECHE?
NO....
SI..... Cómo?.....

11- INSTALACIONES DE ORDEÑE
a. Tiene máquina NO..... SI..... Con línea de leche.....Directo al tacho.....
b. ¿Cómo lava la máquina? (Temperatura del agua, usa detergente?)

Figura 3: Modelo de encuesta realizada a los productores.

- c. Tiene techo SI..... NO....
- d. Tiene piso de cemento SI..... NO....
- e. Tiene instalación de agua SI NO....

12- RUTINA DE ORDEÑE

- a. ¿Cuántos ordeños hacen por día? 1 2.....
- b. ¿Apoya el ternero a la vaca durante el ordeño? SI..... NO.....
- c. Preparación de la ubre: Lava.....Lava y seca.....No lava.....Limpia con trapos húmedos.....
- d. ¿Utiliza sellador al final del ordeño? SI..... NO.....
- e. ¿Qué hace con la leche una vez terminado el ordeño?
Refrigera.... Hierve.... Procesa....
- f. ¿Cómo decide el momento de secado de una vaca?
.....

13- DATOS PRODUCTIVOS Y NUTRICIONALES

- a. ¿Cuál es el promedio de producción de leche por vaca por año? (si no tiene el dato una estimación)
- b. ¿Cuál es el tipo racial predominante?
Indica/Criolla..... Jersey..... Holando..... Cruza Jersey..... Cruza Holando.....
- c. ¿Lleva registros reproductivos? Fecha de servicio..... Fecha de parto
- d. El servicio es: Con toro Inseminación

14- MANEJO NUTRICIONAL DE LA VACA EN ORDEÑE

- a. ¿Cuál es el alimento más común utilizado durante todo el año?
.....
- b. ¿Qué reserva forrajera utiliza?
- ¿La utiliza de manera permanente?O en algunas épocas?.....
- c. Hace nutrición diferencial de la vaca seca NO.....SI.....
¿Cómo?.....

Figura 4: Modelo de encuesta realizada a los productores.

15- MANEJO Y SANIDAD DE LOS TERNEROS

- a. Cuando no apoya con el ternero ¿A qué edad desteta los teneros?
24hs.....48hs.....3-7días.....
- b. ¿A qué edad realiza el desleche? (cuando hace crianza artificial)
.....
- c. ¿Con qué alimenta a los terneros los primeros meses de vida? Leche.....Leche y balanceado..... Sustituto lácteo.....
- d. ¿Dónde se alojan los terneros? Estacas individuales.....Corral comunitario.....
- e. ¿Cuál es el principal problema sanitario de sus terneros en los primeros meses de vida?
Diarreas.....Respiratorio.....Otro.....
- f. ¿Murió algún ternero el último año? NO.....SI..... ¿Cuántos y de qué edad aproximadamente?
¿Puede indicar de que murió/eron?

16- PLAN SANITARIO

Vacunas	Ultima aplicación
Brucelosis	
Aftosa	
Rabia	

17- ENFERMEDADES PARASITARIAS

- a. ¿Cómo controla la garrapata?
- b. ¿Tiene diarrea en animales jóvenes (4-8 meses)?(en el último año)
SI.....NO.....
- c. ¿Qué antiparasitario utiliza?
Criterio de uso: Cuando hay síntomas.....Aplicaciones estratégicas.....solo cuando trata garrapatas.....otros criterios.....

Tabla 4: Resultados test ELISA.

Placa 1: Control Negativo: 0.130

Control Positivo: 0.863

Productor	Animal	ELISA	M/P %	Interpretación
F I	530	0.158	3 %	Negativo
	531	0.869	101 %	Positivo
	532	0.122	0 %	Negativo
	533	0.687	76 %	Positivo
	534	0.216	11 %	Negativo
	535	0.835	96 %	Positivo
	536	0.147	2 %	Negativo
	537	0.144	1 %	Negativo
	540	0.116	0 %	Negativo
	541	0.502	50 %	Positivo
	542	0.734	82 %	Positivo
	543	0.843	97 %	Positivo
	544	0.226	13 %	Negativo
	545	0.780	89 %	Positivo
	546	0.299	23 %	Negativo
	547	0.698	77 %	Positivo
	548	0.710	79 %	Positivo
	F II	520	0.283	20
521		0.148	2	Negativo
522		0.155	3	Negativo
523		0.745	84	Positivo
524		0.782	89	Positivo
526		0.234	14	Negativo
527		0.697	77	Positivo
528		0.130	0	Negativo
529		0.178	6	Negativo
F III	501	0.126	0 %	Negativo
	502	0.877	102 %	Positivo
	503	0.185	7 %	Negativo
	504	0.292	22 %	Negativo
	505	0.205	10 %	Negativo
	506	0.473	46 %	Positivo
	507	0.244	15 %	Negativo
	508	0.201	9 %	Negativo
	509	0.528	54 %	Positivo
	B40	0.201	9 %	Negativo
	B41	0.149	2 %	Negativo

S I	I1	0.232	13 %	Negativo
	I2	0.631	68 %	Positivo
	I3	0.141	1 %	Negativo
	I4	0.744	84 %	Positivo
	I5	0.165	4 %	Negativo
S II	II1	0.701	78 %	Positivo
	II2	0.673	74 %	Positivo
	II3	0.727	81 %	Positivo
Q I	I1	0.202	9 %	Negativo
	I04	0.187	7 %	Negativo
	I05	0.914	107 %	Positivo
	I06	0.144	1 %	Negativo
	I11	0.183	7 %	Negativo
	I13	0.137	0 %	Negativo
	I14	0.202	9 %	Negativo
	I15	0.192	8 %	Negativo
	I58	0.752	85 %	Positivo
	I960	0.168	5 %	Negativo
Q II	II01	0.252	16 %	Negativo
	II02	0.753	85 %	Positivo
	II03	0.211	11 %	Negativo
	II04	0.237	14 %	Negativo
	II05	0.702	78 %	Positivo
	II07	0.907	106 %	Positivo
	II08	0.764	86 %	Positivo
	II63	0.194	8 %	Negativo
	II64	0.223	13 %	Negativo
	II65	0.974	115 %	Positivo
Q III	III7	0.565	59 %	Positivo
	III53	0.482	48 %	Positivo
	III55	0.801	91 %	Positivo
	III56	0.216	11 %	Negativo
	III61	0.190	8 %	Negativo
	III66	0.118	0 %	Negativo
	III67	0.322	26 %	Negativo
	III68	0.308	24 %	Negativo
	III69	0.133	0 %	Negativo
	III955	0.758	86 %	Positivo
P I	I2	0.671	74 %	Positivo
	I4	0.190	8 %	Negativo
	I5	0.527	54 %	Positivo
	I6	0.650	71 %	Positivo

	I8	0.164	4 %	Negativo
	I9	0.143	1 %	Negativo
	I11	0.143	1 %	Negativo
	I12	0.202	9 %	Negativo
	I14	0.195	8 %	Negativo
	I15	0.121	0 %	Negativo
P II	I12	0.900	105	Positivo
	I13	0.788	90	Positivo
	I14	0.790	90	Positivo
	I15	0.245	15	Negativo
	I16	0.809	93	Positivo
	I17	0.180	6	Negativo
	I18	0.793	90	Positivo

Tabla 5: Resultados test ELISA.

Placa 2: Control Negativo: 0.201

Control Positivo: 0.702

Productor	Animal	ELISA	M/P %	Interpretación
P III	III1	0.116	0 %	Negativo
	III2	0.698	99 %	Positivo
	III3	0.134	0 %	Negativo
	III4	0.135	0 %	Negativo
	III5	0.449	49 %	Positivo
	III7	0.134	0 %	Negativo
	III8	0.819	123 %	Positivo
	III10	0.130	0 %	Negativo
	III12	0.161	0 %	Negativo
A I	I621	0.797	119 %	Positivo
	I622	0.238	7 %	Negativo
	I623	0.574	74 %	Positivo
	I624	0.636	87 %	Positivo
	I625	0.560	72 %	Positivo
	I646	0.257	0 %	Negativo
	I647	0.357	31 %	Negativo
A II	I1616	0.206	1 %	Negativo
	I1617	0.692	98%	Positivo
	I1618	0.160	0%	Negativo
	I1619	0.200	0%	Negativo
	I1620	0.537	67 %	Positivo
	I1624	0.458	51%	Positivo

A III	III601	0.200	0 %	Negativo
	III611	0.187	0 %	Negativo
	III612	0.262	12 %	Negativo
	III613	0.142	0 %	Negativo
	III614	0.139	0 %	Negativo
	III615	0.162	0 %	Negativo
B I	IToro	0.794	118 %	Positivo
	I157	0.210	2 %	Negativo
	I865	0.318	23 %	Negativo
	I867	0.813	122 %	Positivo
	I868	0.213	2 %	Negativo
	I870	0.725	105 %	Positivo
	I871	0.695	99 %	Positivo
	I872	0.157	0 %	Negativo
	I874	0.597	79 %	Positivo
B II	II246	0.103	0 %	Negativo
	II512	0.346	29 %	Negativo
	II576	0.089	0 %	Negativo
	II612	0.125	0 %	Negativo
	II854	0.402	40 %	Positivo
	II861	0.589	77 %	Positivo
	II863	0.086	0 %	Negativo
	II864	0.087	0 %	Negativo
	II1236	0.332	26 %	Negativo
B III	III853	0.124	0 %	Negativo
	III854	0.173	0 %	Negativo
	III855	0.439	47 %	Positivo
	III856	0.363	32 %	Negativo
	III857	0.129	0 %	Negativo
	III858	0.525	65 %	Positivo
D I	I876	0.102	0 %	Negativo
	I877	0.183	0 %	Negativo
	I878	0.700	100 %	Positivo
	I879	0.145	0 %	Negativo
	I880	0.258	11 %	Negativo
	I881	0.763	112 %	Positivo
	I882	0.113	0 %	Negativo
	I883	825	125 %	Positivo
D II	II884	0.101	0 %	Negativo
	II885	0.102	0 %	Negativo
	II886	0.102	0 %	Negativo
	II887	0.275	15 %	Negativo
	II888	0.107	0 %	Negativo

T I	I4	0.281	16 %	Negativo
	I8	0.115	0 %	Negativo
	I10	0.599	80 %	Positivo
	I12	0.131	0 %	Negativo
	I15	0.133	0 %	Negativo
	I16	0.100	0 %	Negativo
T II	II1	0.159	0 %	Negativo
	II2	0.151	0 %	Negativo
	II3	0.247	9 %	Negativo
	II4	0.126	0 %	Negativo
	II5	0.103	0 %	Negativo

Imagen 2: Protocolo kit IDEXX Neospora.

PRODUTO IMPORTADO. USO VETERINÁRIO.
VENDA EXCLUSIVA A ÓRGÃO OFICIAL.

Versión Española

Kit para la detección de Anticuerpos frente a *Neospora caninum*

Para uso veterinario exclusivo

Representante exclusivo no Brasil, Importador e Distribuidor

AGASE COMÉRCIO E REPRESENTAÇÕES LTDA.
Av. Emílio Marconato, 1000 - Galvão 83
Jaguatūma - SP - CEP: 13820-000

Fone/Fax: (19) 3847-9900

CNPJ: 63.992.896/0001-71

Responsável técnico: Edison Hideyo Baba
CRMV-SP 2967

Proprietário:

IDEXX Laboratories, Inc.
One Idexx Drive, Westbrook, Maine
04092-EUA

Para assistência técnica:

Contate o representante local IDEXX
ou visite: www.idexx.com/production/contact/
IDEXX Technical Support: 00-800-727-43399

Fabricante:

IDEXX Switzerland AG
Stationsstrasse 12
3097 Liebefeld-Bern
Switzerland

Nombre y uso propuesto

IDEXX Neospora proporciona un método rápido, simple, sensible y específico para detectar anticuerpos frente a *Neospora caninum* (*N.caninum*) en muestras de suero y plasma de rumiantes

Descripción y principios

Las placas de microtitulación se suministran tapizadas con un antígeno inactivado. Las diluciones de las muestras que van a ser procesadas se incuban en los pocillos de dichas placas. Cualquier anticuerpo frente a *N.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 anti-rumiante unida al enzima peroxidasa, el cual es susceptible de unirse a los anticuerpos de rumiante mediante lavado, y se añade un sustrato TMB a los pocillos. El grado de color desarrollado (densidad óptica medida a 450 nm, tras la adición de la solución de frenado) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo específico frente a *N.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.

Reactivos

Conserve todos los reactivos a 2-8°C.

Reactivos	Cantidad
1 Placas tapizadas con Antígeno de <i>N. caninum</i>	2
2 Control Positivo	0,9 ml
3 Control Negativo	0,9 ml
4 Conjugado (IgG anti-rumiante)	24 ml
5 Diluyente de la Muestra	24 ml
A Substrato TMB n.º12	20 ml
B Solución de Frenado n.º3	20 ml
C Solución de Lavado Concentrada (10X)	2 x 100 ml

NOTA: Ver tabla página 29 para las especificaciones de los símbolos internacionales utilizados en las etiquetas del kit.

IDEXX Neospora - 19

18 - IDEXX Neospora

Imagen 3: Protocolo kit IDEXX Neospora.

Materiales necesarios que no se suministran

- Pipetas de precisión monocal o multical canal apropiadas para distribuir de 10 a 1000 µl (los volúmenes de los reactivos descritos en el apartado "Protocolo del ensayo" requieren una pipeta con una precisión inferior o igual al 5%)
- Puntas de pipeta desechables
- Cilindro graduado de 500 ml para la solución de lavado
- Lector de microplacas provisto de filtro de 450 nm
- Agua destilada o desionizada
- Dispositivo para la aplicación y aspiración de solución de lavado
- Trampa de retención de aspirado y desinfectante
- Cámara húmeda o incubadora a +37°C (±3°C)
- Cubiertas para las placas (tapas, papel de aluminio o adhesivo)
- Agitador vortex
- Agitador para microplacas

Precauciones y advertencias para los usuarios

- Maneje todo el material biológico como material potencialmente infectado.
- No use la boca para pipetear.
- No coma, beba ni fume en los lugares donde se esté trabajando con las muestras o los reactivos del kit.
- La solución Substrato TMB irrita los ojos, las vías respiratorias y la piel. Evite el contacto con la piel y los ojos.
- Lleve gafas/prendas/gafas/máscara de protección.
- No exponga la solución TMB a una luz intensa ni a agentes oxidantes. Maneje dicha solución con material limpio de plástico o vidrio.
- Almacene todos los reactivos a 2-8°C. Deje que adquieran 18-26°C antes de utilizarlos, y refrigérelos de nuevo a 2-8°C después del uso.
- Todo el material usado deberá descontaminarse adecuadamente antes de su eliminación. Eliminar el contenido en conformidad con las regulaciones locales, regionales y nacionales.
- Manipule con cuidado los componentes del kit para evitar contaminaciones.
- No use componentes que hayan caducado y no mezcle componentes de diferentes lotes.
- Obtendrá resultados óptimos si sigue escrupulosamente este protocolo. Para mantener la precisión y reproducibilidad es necesario un pipeteo correcto, respetar los tiempos de incubación y un lavado adecuado.
- Los dos controles deben usarse para cada serie de ensayos.
- Utilice sólo agua desionizada o destilada para la preparación de los reactivos que se empleen en el ensayo.
- Los pocillos que no se usen deberán almacenarse bien cerrados dentro de su bolsa de plástico a 2-8°C.
- Sólo para uso veterinario.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado

La Solución de Lavado Concentrada (10X) debe alcanzarse 18-26°C y debe agitarse para asegurar la disolución de posibles precipitados. La Solución de Lavado Concentrada (10X) debe diluirse 1:10 con agua destilada/desionizada antes de su uso (ejemplo: 30 ml de Solución de Lavado Concentrada (10X) + 270 ml de agua por placa a analizar). Preparárase en condiciones estériles, la Solución de Lavado puede almacenarse durante una semana a 2-8°C.

Protocolo del ensayo

Todos los reactivos deben alcanzarse 18-26°C antes de usarse. Los reactivos deben mezclarse mediante un agitado o utilizando el vortex. Usar una punta de pipeta diferente para cada muestra. Tomar las placas tapadas y marcar la posición de las muestras en una hoja de trabajo

1. Dispensar 90 µl de Diluyente de la Muestra en cada pocillo
2. Dispensar 10 µl de muestras y controles sin diluir en los pocillos adecuados de la placa de microtitulación.
3. Dilución final = 1:10.
4. Mezclar los contenidos de los micropocillos removiendo suavemente la placa o mediante el empleo de un agitador para placas de microtitulación.
5. Cubrir la placa de microtitulación con una cubierta (tapa, papel de aluminio o adhesivo) e incubar durante 60 minutos (±5 min.) a +37°C (± 3°C)
6. Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 µl de Solución de Lavado tres veces. Aspirar los contenidos líquidos de todos los pocillos después de cada lavado. Después de la aspiración final, eliminar el fluido de lavado residual de cada placa golpeándola sobre material absorbente. Evitar que las placas se sequen entre los lavados y antes de añadir el reactivo siguiente.
7. Dispensar 100 µl de Conjugado en cada pocillo.
8. Cubrir con una cubierta (tapa, papel de aluminio o adhesivo) e incubar la placa durante 60 minutos (±5 min.) a +37°C (± 3°C) en una cámara húmeda.
9. Repetir el paso 5.
10. Dispensar 100 µl de Substrato TMB n.º12 en cada pocillo.
11. Incubar el Substrato TMB n.º12 a 18-26°C 15 minutos (±1 min.).
12. Frenar la reacción añadiendo a cada pocillo 100 µl de la Solución de Frenado n.º3. La Solución de Frenado n.º3 debe distribuirse en el mismo orden y velocidad utilizados con el Substrato TMB n.º12.
13. Leer los resultados con un fotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Imagen 4: Protocolo kit IDEXX Neospora.

Resultados

Para la validación de la placa, la densidad óptica del Control Positivo (CP A450) no debería ser superior a 2,000 y la densidad óptica del Control Negativo (CN A450) no debería exceder de 0,500. La diferencia de la densidad óptica entre el Control Positivo y el Control Negativo (CP A450 - CN A450) debe ser $\geq 0,300$.

Las placas deben ser leídas dentro de un periodo máximo de 2 horas tras añadir la Solución de Frenado n.º3.

Nota: IDEXX tiene a disposición instrumentos y sistemas de software para el cálculo de valores medios y valores %, y la elaboración de resúmenes de datos.

Cálculos

Debe obtenerse el valor medio de la densidad óptica de las muestras duplicadas. La densidad óptica del control positivo (CPX) así como la densidad óptica de las muestras (Muestra A450) deben corregirse restándole el valor de la densidad óptica del control negativo (CNX).

DO corregida de la Muestra: El valor de cada muestra debe calcularse con relación al Control Negativo y Control Positivo con la siguiente fórmula:

$$CPX - CNX \quad \text{Muestra A450} - CNX \quad M/P \% = 100 \times \frac{\text{Muestra A450} - CNX}{CPX - CNX}$$

Interpretación de los resultados

M/P %	< 30 %	$\geq 30 \%$ y < 40%	$\geq 40 \%$
Interpretación	Negativo	Dudoso	Positivo

Si una muestra continúa siendo dudosa tras una segunda prueba, debería obtenerse una nueva muestra del mismo animal para ser analizada. Si con la nueva muestra se obtiene de nuevo un resultado dudoso, debería contemplarse la situación epidemiológica. Analizar de nuevo la muestra con otra técnica si fuera posible.

Nota: en Francia la interpretación de los resultados es:

M/P %	< 30 %	$\geq 30 \%$ a < 40%	$\geq 40 \%$ a < 80%	$\geq 80 \%$
Interpretación	Negativo	Dudoso	Positivo Débil	Positivo Fuerte

☞ = Modificación en el manual de instrucciones.

Resumen del protocolo del test

Se recomienda especialmente anex de la realización del test por primera vez, y de la utilización de éste resumen, realizar una lectura completa y cuidadosa del manual de instrucciones.

Paso	Acción								
1. Preparación de las recipientes	La Solución de Lavado Concentrada (10X) debe diluirse 1 a 10 con agua destilada/ultrafiltrada antes de su uso.								
2. Preparación de las muestras	Dispensar 90 µl de Diluyente de la Muestra en cada pocillo. Dispensar 10 µl de muestras y Controles sin diluir en los pocillos adecuados de la placa de microtubulación. Dilución final = 1:10. Mezclar los contenidos de los micro pocillos removiendo suavemente la placa o mediante el empleo de un agitador para placas de microtubulación.								
3. Incubación de las muestras	Cubrir la placa de microtubulación con una cubierta (papa, papel de aluminio o adhesivo) e incubar durante 60 minutos (± 5 min.) a $+37^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$).								
4. Lavado de la placa	Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 µl de Solución de Lavado tres veces.								
5. Dilución del Conjugado	Dispensar 100 µl de Conjugado en cada pocillo, esta dilución en cada pocillo.								
6. Incubación del Conjugado	Cubrir e incubar la placa durante 60 minutos (± 5 min.) a $+37^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) en una cámara húmeda.								
7. Repite la etapa 3									
8. Distribución del Substrato	Dispensar 100 µl de Substrato TMB n.º12 en cada pocillo.								
9. Incubación del Substrato	Incubar el Substrato TMB n.º12 a $18-26^{\circ}\text{C}$ 15 minutos (± 1 min.).								
10. Frenado de la reacción	Frenar la reacción añadiendo a cada pocillo 100 µl de la Solución de Frenado n.º3.								
11. Medición de la placa	Leer los resultados con un fotómetro a una longitud de onda de 450 nm.								
12. Interpretación (M/P)	<table border="1"> <tr> <td>M/P %</td> <td>< 30 %</td> <td>$\geq 30 \%$ a < 40%</td> <td>$\geq 40 \%$</td> </tr> <tr> <td>Interpretación</td> <td>Negativo</td> <td>Dudoso</td> <td>Positivo</td> </tr> </table> <p>Si una muestra continúa siendo dudosa tras una segunda prueba, debería obtenerse una nueva muestra del mismo animal para ser analizada. Si con la nueva muestra se obtiene de nuevo un resultado dudoso, debería contemplarse la situación epidemiológica. Analizar de nuevo la muestra con otra técnica si fuera posible.</p>	M/P %	< 30 %	$\geq 30 \%$ a < 40%	$\geq 40 \%$	Interpretación	Negativo	Dudoso	Positivo
M/P %	< 30 %	$\geq 30 \%$ a < 40%	$\geq 40 \%$						
Interpretación	Negativo	Dudoso	Positivo						

Fabricado por:

IDEXX Switzerland AG
Stationsstrasse 12
3097 Liebfeld-Bern, Switzerland

Para asistencia técnica:

contacte al representante local IDEXX
o visite: www.idexx.com/production/contact
IDEXX US Technical Support: 00-800-727-43399

N.º de registro: 1290-RD

*IDEXX y Test With Confidence son marcas o marcas registradas de IDEXX Laboratories, Inc. en los Estados Unidos de América y/o en otros países.

Imagen 5: Instalaciones de ordeño.



Fuente: Fotografía obtenida por el autor

Imagen 6: Instalaciones de ordeño.



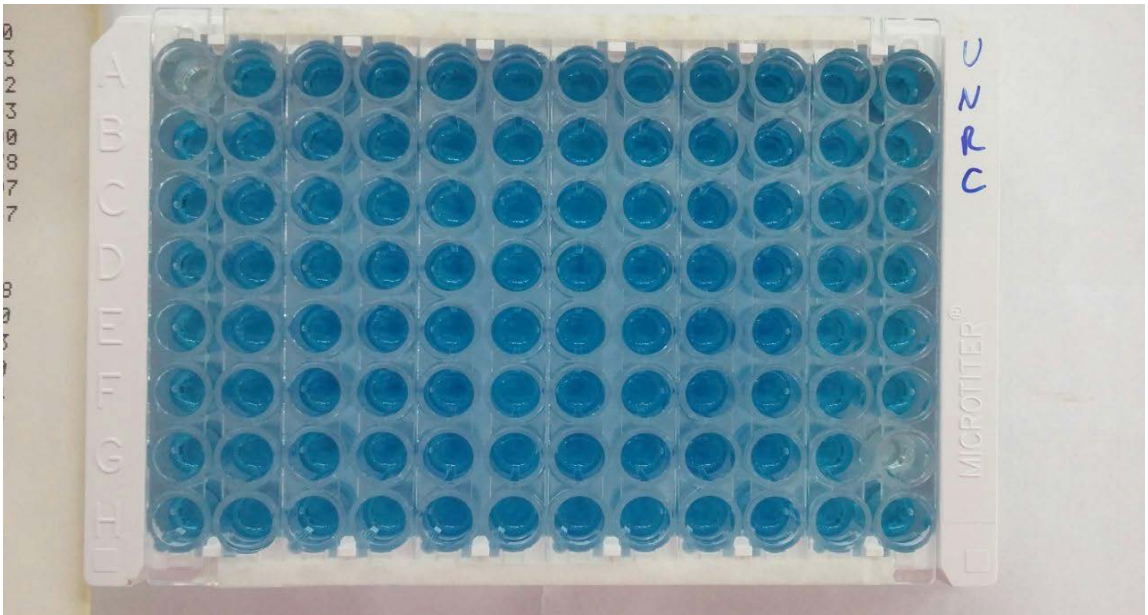
Fuente: Fotografía obtenida por el autor.

Imagen 7: Íntima relación de los caninos con las instalaciones bovinas y su alimento.



Fuente: Fotografía obtenida por el autor.

Imagen 8: Placa ELISA utilizada.



Fuente: Fotografía obtenida por el autor.

BIBLIOGRAFIA

- Almeria, S., De Marez, T., Dawson, H., Araujo, R., Dubey, J.P., Gasbarre, L.C. 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25(7): 383-392.
- Anderson, M.L., Palmer, C.W., Thurmond, M.C., Picanso, J.P., Blanchard, P.C., Breitmeyer, R.E., Kinde, H.A. 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J Am Vet Med Assoc.* 207(9): 1206-1210.
- Anderson, M.L., Reynolds, J.P., Rowe, J.D., Sverlow, K.W., Packham, A.E., Barr, B.C., Conrad, P.A. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 210: 1169-1172.
- Anderson, M.L., Andrianarivo A.G., Conrad P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 417-431.
- Atkinson, R., Harper, P.A.W., Reichel, M. P., Ellis, J.T. 2000. Progress in the Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infections of Cattle. *Parasitol Today.* 16(3): 110-114.
- Barling, K.S., Mcneill, J.W., Thompson, J.A., Paschal, J.C., Mccollum, F.T., Craig, T.M., Adams, L.G. 2000. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J Am Vet Med Assoc.* 217(9): 1356-1360.
- 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. 1991a. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J Vet Diagn Invest.* 3: 39-46.
- Barr BC, Rowe JD, Sverlow KW, 1994, Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J Vet Diagn Invest.* 6: 207-215
- Barta, J.R., Dubey, J.P. 1992. Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by Western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitol Res.* 78(8): 689-694.

- 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-santa-quitera, A., Björkman, C., Frössling, J., Von Blumröder, D., Ortega-Mora, L.M. 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet Parasitol*. 137(1): 17-27.
- Basso, W.,L., Venturini, M.C., Venturini, D.E., Kwok, O.C. Shen, S.K., Dubey, J.P. 2001. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol*. 87: 612-618.
- Bjerkas, I., Mohn, S.F. Presthus. J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd*. 70:271-274.
- Bjerkas, I., Dubey. J.P. 1991. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. *Acta Vet Scand*. 32: 407-410.
- BJerkas, I., Jenkins, M.C., Dubey. J.P. 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1: 214-221.
- Björkman, C., Holmdahl, O.J. Ugglå, A. 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet Parasitol*. 68: 251-260.
- Boulton, J.G., Gill, P.A. Cook, R.W. Fraser, G.C. Harper, P.A., Dubey, J.P. 1995. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. *Aust Vet J*. 72: 119-120.
- Buxton, D., Mcallister, M.M., Dubey, J.P. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol*. 18: 546-552.
- Caetano-Da-Silva, A., Ferre, I., Collantes-Fernández, E., Navarro, V., Aduriz, G., Ugarte-Garagalza, C., Ortega-Mora, L. M. 2004. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. *Theriogenology*. 62(7): 1329-1336.
- Chimicz J.; G. Dorr; E. Cornelius. 2013. Producir XXI, Bs. As
- Corbellini, L.G., Smith, D.R., Pescador, C.A., Schmitz, M., Correa, A., Steffen, D.J., Driemeier, D. 2006. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev Vet Med*. 74(2): 130-141.
- Dannatt, L. 1997. *Neospora caninum* antibody levels in an endemically-infected dairy herd (Reprinted from *Cattle Practice*, vol 5, 1997. *Irish Vet J*. 51(4): 200-201.

- Davison, H.C., Otter, A., Trees, A.J. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 29(10): 1683-1689.
- De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Gasbarre, L. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int J Parasitol.* 29: 1647-1657.
- Dijkstra, T., Eysker, M., Schares, G., Conraths, F.J., Wouda, W., Barkema, H.W. 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol.* 31: 747-752.
- 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., Barkema, H.W., Eysker, M., Beiboer, M.L., Wouda, W. 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Vet Parasitol.* 110: 161-169.
- Dubey, J.P.; Carpenter, J.L.; Speer, C.A.; Topper, M.J.; Uggla, A. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 192: 1269-1285.
- Dubey, J.P.; Porterfield, M.L. 1990. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J Parasitol.* 76 (05): 732-734.
- Dubey, J.P.; Lindsay, D.S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 67: 1-59.
- Dubey J.P.; Lindsay, D.S.; Adams, D.S.; Gay, J.M.; Baszler, T.V.; Blagburn, B.L.; Thulliez P. 1996. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am J Vet Res.* 57: 329-336.
- Dubey, J.P. 1999. Recent advances in *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 84: 349-367.
- Dubey, J.P.; Hill, D.E.; Lindsay, D.S.; Jenkins, M.C.; Uggla, A.; Speer C.A. 2002. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. *Trends Parasitol.* 18: 66-69.
- Dubey, J.P. 2003. Neosporosis in cattle. *J Parasitol.* 89 (Suppl): S42-S56.
- Dubey J.P.; Buxton D.; Wouda W. 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. *J Comp Pathol.* 134: 267-289.

- Dubey J.P.; Schares G.; Ortega-Mora L.M. 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 20: 323-367.
- Dubey, J.P.; Jenkins, M.C.; Rajendran, C.; Miska, K.; Ferreira, L.R.; Martins, J.; Choudhary, S. 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol. 181 (2): 382-387.
- Dubey, J.P.; Schares, G. 2011. Neosporosis in animal the last five years. Vet Parasitol. 180(1): 90-108.
- Echaide I.E. 2000. “La Neosporosis Bovina”. Jornada sobre Enfermedades Emergentes del Bovino”. UNRC – Rio Cuarto, Argentina.
- Ferre, I., Aduriz, G., Del-Pozo, I., Regidor-Cerrillo, J., Atxaerandio, R., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L.M. 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. Theriogenology. 63(5): 1504-1518.
- Fioretti D., Pasquali P., Diaferia M., Mangili V., Rosignoli, L. 2003. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 50: 399-404.
- Fort M. 2001. *Neospora caninum*: Estudio seroepidemiológico en bovinos de la provincia de La Pampa.
- Gondim, L.F., Mcallister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of (*Neospora caninum*). Int J Parasitol. 34 (2): 159-161.
- Guy, C.S., Williams, D.J.L., Kelly, D.F., McGarry, J.W., Guy, F., Björkman, C., Smith, R.F., Trees, A.J. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. Vet Rec. 149: 443-449.
- Hemphill, A., Fuchsa, N., Sonda, S., Hehlb A. 1999 The antigenic composition of *Neospora caninum*. Int J Parasitol. 29: 1175-1188.
- Hietala, S.K.; Thurmond, M.C. 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. Int J Parasitol. 29(10): 1669-1676.
- Innes, E.A., Wright, S.E. Maley, S., Rae, A., Schock, A., Kirvar, E. Bartley, P., Hamilton, C., Carey, I.M., Buxton, D. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. Int J Parasitol. 31: 1523-1534.
- Innes, E.A., Andrianarivo, A.G., Björkman, C., Williams, D.J., Conrad P.A. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. Trends Parasitol. 18: 497-504.

- Jardine, J.E. 1996. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet Parasitol.* 62: 231-240.
- JENKINS, M.C., WOUDA, W., DUBEY, J.P. 1997. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4(3): 270-274.
- John P. Thilsted; J. P. Dubey. 1989. Neosporosis-Like Abortions in a Herd of Dairy Cattle.
- King, J.S., Šlapeta, 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.
- Lertora, W.J; Mohr Betiana, N; Mosqueda, M.G; Sánchez Negrette, M. 2010. Detección de neospora caninum en fetos bovinos abortados espontáneamente en el nordeste argentino. Trabajo presentado en la Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2009, Resistencia, Argentina.
- López-Gatius, F., Pabón, M., Almeria, S. 2004. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology.* 62(3): 606-613.
- Maley, S.W, Buxton, D., Thomson, K.M., Schriefer, 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.W., Buxton, D., Rae, A.G., Wright, S.E., Schock, A., Bartley, P.M., Innes, E.A. 2003. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J Comp Pathol.* 129(2): 186-195.
- 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., Björkman, 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.
- McGarry, J.W., Stockton, C.M. Williams, D.J. Trees, A.J. 2003. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. *J Parasitol.* 89: 628-630.
- Moore, D.P., Campero, C.M., Odeón, A.C., Posso, M.A., Cano, D., Leunda, M.R., Späth, E. 2002. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet Parasitol.* 107(4): 303-316.

- Moore, A.C.; Odeón, M.C.; Venturini, C.M. Campero. 2005. Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. Revista Argentina de microbiología. v.37 n.4 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Moore, D.P., Pérez, A., Agliano, S., Brace, M., Cantón, G., Cano, D., Campero, C.M. 2009. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. Vet Parasitol.161 (1): 122-125.
- Moskwa, B., Pastusiak, K., Bien, J., Cabaj, W. 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. Parasitol Res. 100(3): 633-636.
- O'toole, D., Jeffrey, M. 1987. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf Vet Rec. 121: 563-566
- Okeoma, C.M., Williamson, N.B., Pomroy, W.E., Stowell, K.M., Gillespie, L. 2004. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. Vet Parasitol.122(4): 307-315.
- Ortega-Mora, L.M., Gottsein, F.J., Conraths, F.J., Buxton, D. (Ed.). 2007. Protozoal abortion in farm ruminants: guidelines for diagnosis and control. © CAB International.
- Otranto, D., Llazari, A., Testini, G., Traversa, D., Di regalbono, 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.
- Ould-Amrouche, A., Klein, F., Osdoit, C., Mohammed, H.O., Touratier, A., Sanaa, M., Mialot, J.P. 1999. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. Vet Res. 30(5): 531-538.
- Pabón, M., López-Gatius, F., García-Ispierto, I., Bech-Sàbat, G., Nogareda, C., Almería, S. 2007. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: A 3-year study. Vet Parasitol.147(1): 40-46.
- Packham, A., Sverlow, K., Conrad, P., Loomis, E., Rowe, J., Anderson, M., Marsh, A., Cray, C., Barr, B. 1998. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol. 5: 467-473.
- Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calthood mortality. Can J Vet Res. 60: 133-139.
- Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. J Parasitol. 83: 82-87.

- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozaño, 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. *Int. J Parasitol.* 30, 906-909.
- Peters, M., Lutkefels, E., Heckerroth, A.R., Schares, G. 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 31: 1144-1148.
- 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-Gozaño, A., Pereira-Bueno, J., Tabares, E., Innes, E.A., Gonzalez-Paniello, R., Ortega-Mora, L.M. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int J Parasitol.* 29(8): 1201-1208.
- Quintanilla-Gozaño, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-Mora, L.M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int J Parasitol.* 30: 900-906.
- 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.
- Rodrigues, A.A.R., Gennari, S.M., Aguiar, D.M., Sreekumar, C., Hill, D.E., Miska, K. B. Dubey, J.P. 2004. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Vet Parasitol.* 124(3): 139-150.
- Rodríguez A.M. 2015. Transmisión horizontal y vertical de *Neospora caninum* en tres sistemas de cría bovina. Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al título de *magister scientiae* en sanidad animal – UNMdP.
- Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J.P. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res.* 84: 50–53
- Sager, H., Fischer, I., Furrer, K., Strasser, M., Waldvogel, A., Boerlin, P., Audige, L., Gottstein, B. 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet Parasitol.* 102:1-15.
- Sánchez, G.F., Morales, S.E., Martínez, M.J., Trigo, J.F. 2003. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can J Vet Res.* 67(2): 142.

- 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., Söndgen, 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., Klöß D., Wurm R., Rauser 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., Bärwald, A., Staubach, C., Ziller, M., Klöss, D., Schröder, R., Conraths, F.J. 2004. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology.* 129(03): 301-309.
- Šlapeta, J.R., Modrý, D., Kyselová, I., Hořejš, R., Lukeš, J., Koudela, B. 2002. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet Parasitol.* 109(3): 157-167.
- Söndgen, P., Peters, M., Bärwald, A., Wurm, R., Holling, F., Conraths, F.J., Schares, G. 2001. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet Parasitol.* 102(4): 279-290.
- Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Uggla, A., Björkman, C. 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 85: 227-234.
- Styrts, B., Sugarman, B. 1991. Estrogens and infection. *Rev Infect Dis.* 13(6): 1139-1150.
- Súper Campo. 2015. Se reactiva la cuenca lechera de Colonia Aurora. En: <http://supercampo.perfil.com/2015/01/la-reactivacion-de-la-cuenca-lechera-de-colonia-aurora-es-un-hecho/>
- Thornton, R.N., Thompson, E.J., Dubey, J.P. 1991. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *N Z Vet J.* 39: 129-133.
- Towbin, H., Staehelin, 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

- Trees, A.J., Davison, H.C., Innes, E.A., Wastling, J.M. 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 29: 1195-1200.
- Trees, A.J., Williams, D.J. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21(12): 558-561.
- Van Maanen, C., Wouda, W., Schares, G., Von Blumröder, D., Conraths, F.J., Norton, R., Hemphill, A. 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol.* 126(4): 351-364.
- Wilkowsky, S.E., Bareiro, G.G., Mon, M.L., Moore, D.P., Caspe, G., Campero, C., Romano, M.I. 2011. An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 23(5): 971-976.
- Williams, D.J.L., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R. F., Trees, A.J. 2000. *Neospora caninum* associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology.* 121(04): 347-358.
- Wouda, W., Dubey, J.P., Jenkins, M.C. 1997. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J Parasitol.* 83: 545-547.
- Wouda, W., Dijkstra, T., Kramer, A.M.H., Van Maanen, C., Brinkhof, J. M.A. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 29(10): 1677-1682.
- Yao, L., Yang, N., Liu, Q., Wang, M., Zhang, W., Qian, W.F., Ding, J. 2009. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitology.* 136(11): 1251-1256