

CIENTÍFICA

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR

Facultad de Ciencias Veterinarias y Biológicas

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum*
EN OVINOS DE CRIANZA EXTENSIVA DE LA SAIS TÚPAC AMARU,
JUNÍN”

Tesis para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

STEPHANY LIZBETH CHILGE MALLQUI

BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LIMA – PERÚ

2018

Acta de Sustentación de Tesis

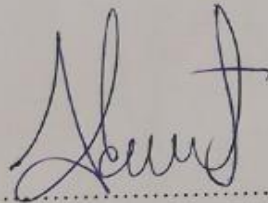
Siendo las 18:00 horas del 26 de Noviembre de 2018, en el Aula L - 105 del Campus Villa II, bajo la presencia del jurado examinador nombrado por **Resolución Directoral Académica de Carrera N° 076-DACMVZ-DAFCVB-U. CIENTÍFICA-2018**, presidido por el Dr. Alexei Santiani Acosta, M.V. Milena Paola Montenegro Vega, Mg. Raquel Watanabe Watanabe y el Mg. Siever Morales Cauti como Director - Observador. Se procedió en acto público a la sustentación de la tesis "**PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA Neospora caninum EN OVINOS DE CRIANZA EXTENSIVA DE LA SAIS TÚPAC AMARU, JUNÍN**".

El presidente concedió el uso de la palabra a la Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Chilge Mallqui Stephany Lizbeth**, para la sustentación de su tesis. Luego de la exposición, la bachiller absolvió las preguntas del Jurado y del público asistente.

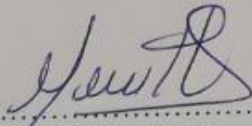
El Jurado acordó otorgarle la nota de:

..... Diecisiete (17)

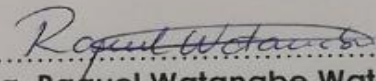
El presidente del Jurado dio por culminado el acto de sustentación y levantó la sesión a las 19:00hrs.



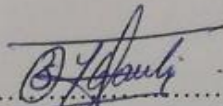
.....
Dr. Alexei Santiani Acosta
Presidente



.....
M.V. Milena Paola Montenegro Vega
Miembro



.....
Mg. Raquel Watanabe Watanabe
Miembro



.....
Mg. Siever Morales Cauti
Director - Observador

021-2018

T // (511) 610-6400
opción 2

Campus
Panamericana Su

Contenido

| | |
|---|-----------|
| I. INTRODUCCIÓN | 5 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 7 |
| 1.1. Generalidades de ovinos | 7 |
| 1.2. Ovino raza Junín | 8 |
| 1.3. Enfermedades en ovinos | 9 |
| 1.4 Neosporosis | 9 |
| 1.4.1. Etiología | 10 |
| 1.4.3. Estadios parasitarios | 10 |
| 1.4.4 Ciclo biológico..... | 12 |
| 1.4.5 Epidemiología..... | 14 |
| 1.4.6. Transmisión..... | 15 |
| 1.4.7. Patogenia..... | 17 |
| 1.4.8. Inmunidad..... | 19 |
| 1.4.9. Signos clínicos..... | 22 |
| 1.4.10. Lesiones | 23 |
| 1.4.11. Diagnóstico | 24 |
| 1.4.12. Tratamiento..... | 27 |
| 1.4.13. Control..... | 28 |
| 1.4.14. Prevención | 28 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| Localización y ambiente..... | 30 |
| a. Población y muestra..... | 30 |
| b. Diseño experimental..... | 31 |
| c. Diseños metodológicos | 31 |
| i. Toma de muestra | 31 |
| ii. Procesamiento de muestras | 31 |
| IV. RESULTADOS | 35 |
| V. DISCUSIÓN | 37 |
| VI. CONCLUSIONES | 40 |
| VII. RECOMENDACIONES..... | 41 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |

RESUMEN

El objetivo del presente estudio es determinar la prevalencia de seropositivos de anticuerpos contra *Neospora caninum* en ovinos de crianza extensiva en la SAIS Túpac Amaru, Junín. Se evaluaron 367 sueros sanguíneos de ovinos provenientes de la SAIS Túpac Amaru del departamento de Junín, tomando en cuenta las variables, edad, sexo y calidad genética; las muestras fueron analizadas por la prueba ELISA indirecta para la detección de anticuerpos anti *Neospora caninum*, teniendo como resultado una prevalencia de 0,82% (3/367) de ovinos seropositivos a anticuerpos contra *Neospora caninum*. Estos resultados confirman la presencia de *Neospora caninum* en ovinos de la SAIS Túpac Amaru y la necesidad de nuevos estudios que identifiquen la presencia de este protozooario en explotaciones ovinas del país.

ABSTRACT

The objective of the present study is to determine the prevalence of seropositive antibodies against *Neospora caninum* in sheep of extensive breeding in SAIS Túpac Amaru, Junín. We evaluated 367 blood sera from sheep from the SAIS Túpac Amaru of the department of Junín, taking into account the variables, age, sex, and genetic quality; the samples were analyzed by the indirect ELISA test for the detection of antibodies against *Neospora caninum*. Resulting in a prevalence of 0,82% (3/367) of seropositive sheep antibodies against *Neospora caninum*. These results confirm the presence of *Neospora caninum* in sheep of SAIS Túpac Amaru and the need for new studies that identify the presence of this protozoon in sheep farms in the country.

I. INTRODUCCIÓN

En el Perú, la ganadería desarrollada en la región andina se caracteriza por utilizar pastos naturales y se desenvuelve principalmente en los valles interandinos, siendo en su mayoría de crianza extensiva; la especie que predomina es la ovina, existiendo una población de 9'523,198 de ovinos para el censo del 2012. Sin embargo, muestra un descenso de 21,2% a comparación de los censos agropecuarios de años anteriores; a pesar de esto, ha mantenido su presencia debido a que se integra con otros sistemas de crianza, adaptada a diversos climas, manteniéndose como un sistema de producción económicamente importante (INEI, 1994, 2012). Por lo tanto, el estudio de enfermedades relacionados a la crianza de ovinos que afectan al sistema de producción es una necesidad (Díaz y Oviedo, 2013).

Dentro de estas, la neosporosis es una enfermedad causada por el protozoo *Neospora caninum* que tiene distribución mundial, importante por la falla reproductiva que causa y que ha sido reportada en las principales zonas productoras de ganado bovino del mundo, la cual afecta a una variedad de animales, teniendo como hospedador definitivo a los canidos, y como hospedadores intermediarios a los rumiantes, camélidos sudamericanos, équidos, entre otros.

La importancia de la neosporosis ovina, se encuentra relacionada a las pérdidas productivas y reproductivas que ocasionan, relacionadas con el aborto, la reducción del número de crías paridas, la reducción en la producción láctea y de lana; a pesar de no tener la misma relevancia que en los bovinos de otras partes del mundo. Sin embargo, en territorios donde se cría bovinos y ovinos a la vez, estos últimos pueden, eventualmente, participar de la epidemiología de la infección.

En el Perú, existen varios estudios realizados sobre el *Neospora caninum*, siendo uno de ellos el realizado en el departamento de Junín encontrándose en llamas, bovino (Casas *et al.*, 2006; Granados *et al.*, 2014), donde se reportan

seroprevalencias variadas y con características propias. Por lo que resulta importante realizar estudios como este que permitan una evaluación epidemiológica de esta enfermedad, buscando establecer estrategias de prevención y control.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Generalidades de ovinos

La crianza de ovinos en el Perú tiene importancia económica, social y ecológica; representa el sustento de un gran sector de la población rural, ya que se cría en su mayoría en áreas no aptas para la agricultura y como una actividad a la par de la bovinocultura (Aliaga, 2009).

En el Perú, la crianza de ovinos se ha podido mantener porque se realiza a la par que la de otros animales como vacunos y camélidos, criados encima de los 4000 m s.n.m., dentro de la economía familiar del poblador andino, sin índices de productividad favorable (Díaz y Oviedo, 2013)

Según el IV Censo Nacional Agropecuario peruano, llevado a cabo en el 2012, la población ovina es de 9'523,198 de animales, mostrando un descenso de 21,2% con respecto al censo agropecuario de 1994. Los criollos es la raza de mayor población, representando el 81,0% del total. Le siguen: la raza Corriedale, con el 11,4%, la Hampshire Down, 2,6%, la Black Belly, 0,9% y otras razas, 4,1%, respectivamente. Según el INEI (1994, 2012), la mayor parte de la población de ganado ovino está concentrada en la sierra, con 8.972.200 cabezas, que representa el 94,2% del total.

En la costa y la selva, la raza predominante es criollos con 79,8% y 71,3%, respectivamente. La sierra, como ya se ha mencionado, concentra una mayor cantidad de ovinos, siendo Puno, Cusco y Junín los departamentos que presentan la población de ovinos más importante. Junín presenta una población de 779.297 cabezas de ganado (INEI, 2012), siendo parte de estas criadas de manera extensiva por sociedades agrícolas, como la sociedad agrícola de interés social (SAIS) Túpac Amaru, que representa una población total de 81.533 cabezas de ganado ovino de la raza Junín.

En el Perú, la cadena productiva de ovino viene aumentando a una tasa promedio anual de 2,17%. Entre los años 2000 y 2012, considerándose la producción de carne, lana y piel en su conjunto, el valor bruto de la producción tuvo un crecimiento de 16,2% (Díaz y Oviedo, 2013).

Con respecto a la producción de lana, esta ha disminuido notablemente en las últimas décadas y en el Perú, desde el 2001, va disminuyendo en una tasa anual de -1,88%, debido a la competencia de las fibras naturales y sintéticas, generando un bajo precio en el mercado lanero mundial, reemplazándola por actividades más rentables, (MINAGRI, 2017), como varios modelos de producción de carne para generar ingresos alternativos (Buratovich y Villa, 2004; MINAGRI, 2017).

La producción de carne en el Perú va en crecimiento, registrando un incremento del 6,75% entre el año 2007 y 2012; siendo Puno, Cusco, Junín y Ayacucho los principales productores. El abastecimiento de carne en su mayoría se desarrolla de manera informal, representando un 70% de la producción nacional de carne que en su mayoría es de autoconsumo y el 30% de comercio formal (Días y Oviedo, 2013). La problemática “de la crianza de ovinos en el país radica, principalmente en los siguientes factores: baja producción y productividad, bajos índices reproductivos, escasa disponibilidad de material genético de calidad, deficiente manejo animal y sanitario” (Molina 2013: 7).

1.2. Ovino raza Junín

La raza Junín fue la principal raza productiva de la SAIS Túpac Amaru, la cual tuvo sus inicios en 1952 por la Cerro de Pasco Corporation, y fue continuada por la SAIS Túpac Amaru en razón a la ley 17716 Ley General de Reforma Agraria del 30 de marzo de 1970 (Linares, 2012). Se caracteriza por ser un ovino de alta rusticidad, cuerpo robusto, buen aplomo, vellón de color blanco y de rizo uniforme; La lana debe presentar un diámetro de 20 a 28 micrones, el empadre es realizado cuando las borreguillas alcanzan un peso promedio de 40 kilos y tienen 18 meses de edad (Santiago, 2011; SAIS, 2012).

1.3. Enfermedades en ovinos

Se sabe que existe un amplio listado de etiologías de naturaleza infecciosa, incluyendo agentes virales, parasitarios, fúngicos y bacterianos, que pueden producir importantes enfermedades en la industria ovina (Allen, 2004), entre las cuales resaltan la agalaxia contagiosa, epididimitis ovina, clamidiosis ovina, infección por el virus de la peste de pequeños rumiantes, salmonelosis, viruela ovina (OIE, 2008), estomatitis vesicular, enterotoxemia, colibacilosis, lengua azul y las parasitarias como la hidatidosis, coccidiosis, toxoplasmosis y neosporosis.

1.4 Neosporosis

La neosporosis bovina es una enfermedad que se encuentra a nivel mundial, teniendo importancia por el fallo reproductivo en las principales zonas productoras de ganado bovino del planeta (Dubey *et al.*, 2007). Se denomina neosporosis a la enfermedad causada por el protozoo *Neospora caninum*, el cual produce alteraciones neuromusculares en los caninos y abortos o mortalidad neonatal en los bovinos (Dubey, 1999).

En 1990 se reportó el primer informe de *Neospora caninum* como una infección natural en ovejas, en un cordero con infección congénita de una semana de edad, incapaz de levantarse después del nacimiento, el cual presentó quistes tisulares del parásito en el cerebro y médula espinal (Dubey *et al.*, 1990). Una de las primeras investigaciones sobre la importancia del *Neospora caninum* en la reproducción en los ovinos fue la inoculación de taquizoítos del parásito en las ovejas con 65, 90 y 120 días de gestación, esto dio como resultado aborto espontáneos en las ovejas inoculadas al día 65 de gestación, pero las que fueron inoculadas a los 120 días de gestación, tuvieron crías que nacieron clínicamente normales (McAllister *et al.*, 1998).

Se detectó la presencia de *Neospora caninum* en fetos abortados de ovejas que fueron infectadas naturalmente, esto se demostró a través de la técnica PCR del cerebro en los fetos abortados (Howe *et al.*, 2012).

1.4.1. Etiología

El *Neospora caninum* es un protozoo intracelular obligado, que tiene como hospedadores definitivos al perro, coyote (*Canis latrans*), lobos (*Canis lupus*) y como hospedadores intermediarios a bovinos, ovinos, búfalos, ciervos y equinos (Dubey, 2003). Produce alteraciones neuromusculares en los perros y abortos o mortalidad neonatal en los bovinos (King *et al.*, 2010; Dubey *et al.*, 2011).

La primera información sobre él se tuvo en 1984, en Noruega, donde se detectó una camada de perros con miositis y encefalomiелitis, encontrando un parásito similar a *Toxoplasma gondii* en el sistema nervioso central y muscular, sin encontrarse anticuerpos contra el *toxoplasma* (Bjerkas *et al.*, 1984).

1.4.2 Clasificación taxonómica

Neospora caninum está clasificado dentro del phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina, familia Sarcocystidae y género Neospora (Dubey *et al.*, 2003). Mediante el uso de microscopios electrónicos se reconocieron organelas características de ese phylum como micronemas, roptrias y gránulos densos (Dubey *et al.*, 2002). El *Neospora caninum* es similar a *toxoplasma gondi*, y está relacionado taxonómicamente a otros protozoos formadores de quistes (Cordero *et al.*, 2000).

1.4.3. Estadios parasitarios

Son, por su reconocimiento en sus ciclos: esporozoítos, taquizoítos y bradizoítos. Estos dos últimos se encuentran en hospederos intermediarios y son asexuales del parásito, con localización intracelular; por otro lado, los esporozoítos se eliminan en las heces del perro (Dubey y Lindsay, 1996; Gondim *et al.*, 2002).

Los taquizoítos miden 3 a 7 μm de largo por 1 a 5 μm de ancho y tienen forma de media luna o globular, según la etapa de división en la que se encuentren (Dubey y Lindsay, 1996). Se ha encontrado taquizoítos en células renales, fibroblastos,

neuronas, hepatocitos, miositos, células endoteliales y macrófagos (Dubey *et al.*, 2002). Los taquizoítos están compuestos por una película integrada por un plasmalema y un microporo, el cual contiene numerosos microtúbulos que recorren longitudinalmente la superficie interna de la membrana un complejo apical que consta de dos anillos apicales anteriores. También presenta un conoide, de hasta 150 micronemas y 8-18 roptries (Speer y Dubey, 1989).

El taquizoíto invade la célula diana, dentro de la cual es “rodeado por una vacuola parasitófora cuya membrana se origina a partir de la superficie de la célula hospedadora y es modificada por el parásito poco después de la invasión. El taquizoíto secreta a su vez proteínas que originan una red tubular en el espacio intercelular dentro de la vacuola (Hemphill *et al.*, 1998) e inicia su proceso de división por endodiogenia (Speer y Dubey, 1989)” (Risco 2008: 4-5).

Los taquizoítos de crecimiento rápido son eliminados por la respuesta inmunitaria del huésped que impulsa el desarrollo hacia la etapa bradyzoite enquistadas dividiéndose lentamente (Hemphill, 2006).

Los bradizoítos tiene una replicación más lenta que los taquizoítos, llegando a medir aproximadamente “de 5 a 8 μm de largo y de 1 a 2 μm de ancho y poseen las mismas organelas que el taquizoíto [...] (Dubey *et al.*, 2004)”. A diferencia del taquizoíto, el bradizoíto presenta en su interior un “núcleo en posición subterminal, posee menos roptrias y más gránulos de amilopectina” (Risco 2008: 5).

Los bradizoítos están contenidos en “quistes tisulares formados en el espacio intracitoplasmático de una sola célula” (Risco 2008: 5). Los quistes tisulares presentan forma redonda u oval y su tamaño puede variar desde 50 hasta 107 μm . La pared quística presenta un grosor que oscila entre 2,5 a 4 μm y está constituida por dos capas: una membrana citoplasmática externa lisa, proveniente de la vacuola parasitófora, y otra capa interna gruesa, conformada por numerosas vesículas y gránulos unidos a la membrana (Barr *et al.*, 1991; Dubey *et al.*, 2006).

Se ha observado quistes tisulares en el tejido nervioso y con menor frecuencia en tejido muscular esquelético (Dubey *et al.*, 2002).

El estadio infectante para los hospedadores intermediarios es el esporozoíto, localizándose dentro de los ooquistes esporulados. El ooquiste se forma tras la multiplicación sexual del parásito y representa la fase resistente en el medio ambiente (McAllister *et al.*, 1998); presenta forma esférica o subesférica y mide aproximadamente 11,7 μm de largo, 11,3 μm de ancho y la pared presenta un grosor entre 0,6 y 0,8 μm , los ooquistes contienen dos esporoquistes lo cual contiene a su vez cuatro esporozoítos cada uno, los esporozoítos tienen un tamaño aproximado de 6,5 μm de largo por 2,0 μm de ancho (McAllister *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1999).

1.4.4 Ciclo biológico

El *Neospora caninum* tiene un ciclo de vida de dos fases: una sexual, en los hospedadores definitivos como el perro (McAllister *et al.*, 1998) y coyote (Gondim *et al.*, 2004), que además también pueden ser hospedadores intermediarios. Y la fase asexual, que se desarrolla en los hospederos intermediarios como bovinos, equinos, ovinos (Dubey y Lindsay, 1990), caprino (Barr *et al.*, 1992) y ciervos (Gondim *et al.*, 2004); con formación de taquizoítos y quistes tisulares conteniendo bradizoítos (Dubey y Lindsay, 1996).

Los hospederos definitivos se infectan ingiriendo tejidos de hospedadores intermediarios que contengan el quiste tisular alojado en placentas y restos de fetos abortados (Dubey, 2003), conteniendo en su interior los bradizoítos. La ingesta de quistes tisulares es el único proceso que puede inducir a la excreción de ooquistes en los hospederos definitivos (Dubey y Lindsay, 1996; McAllister *et al.*, 1998). Una vez ingeridos los quistes tisulares, “la pared del quiste es degradada por los jugos gástricos, liberando las formas parasitarias que inician los estados entero-epiteliales” (Girata 2016: 32), dándose la multiplicación sexual con la posterior formación de ooquistes no esporulados eliminados con las heces entre

8-14 días postinfección (McAllister *et al.*, 1998) y por un periodo patente variable. Ya en el medio ambiente, el ooquiste inicia el proceso de esporulación en un transcurso de 24 a 72 horas donde se vuelven infectivos (McAllister *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2004).

Los hospederos intermediarios pueden infectarse por la ingesta de agua o alimentos contaminados con ooquistes, liberándose los esporozoítos a nivel del tracto gastrointestinal, atravesando la pared intestinal y accediendo a la circulación sanguínea o linfática, transformándose rápidamente en taquizoítos (Lindsay *et al.*, 1999). Los taquizoítos son los responsables de la fase aguda de la infección. Penetran las células por invasión activa en un promedio de cinco minutos (Hemphill *et al.*, 1996), en donde son englobados en una vacuola parasitófora, conformada por la célula hospedadora y el parásito, iniciando la multiplicación por endogamia en una gran variedad de células (Speer y Dubey, 1989) incluyendo miocitos, células neurales, macrófagos, hepatocitos, fibroblastos, neutrófilos y células endoteliales y renales (Dubey *et al.*, 1988; Bjerkas y Presthus, 1989), donde una célula puede contener más de 100 taquizoítos (Gondin *et al.*, 2002). A pesar de ser un parásito intracelular obligatorio, se puede encontrar en el espacio extracelular tras la ruptura de la célula hospedadora, para que dentro de pocas horas se dé inicio a los aparatos de adhesión e invasión a nuevas células dianas (Hemphill *et al.*, 1996).

La fase crónica se presenta cuando los taquizoítos se transforman en bradizoítos, con escasa o nula multiplicación en el interior de los quistes tisulares, esto se debe probablemente a los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador (Buxton *et al.*, 1998; Buxton *et al.*, 2002). Los quistes tisulares se pueden localizar, por lo general, en tejido nervioso, en infecciones naturales y experimentales (Peters *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2002) y en tejido muscular (Dubey *et al.*, 2004).

Si durante la gestación de un hospedero intermediario, se da una primoinfección por ingesta de ooquistes esporulados o se reactiva una infección crónica de los

bradizoítos a taquizoítos, estos pueden llegar a la placenta por vía sanguínea e infectar al feto en desarrollo (Williams *et al.*, 2009).

1.4.5 Epidemiología

Prevalencia

Son varios “los estudios de prevalencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* [que] indican que la neosporosis presenta una amplia distribución mundial, encontrándose en Australia, Nueva Zelanda, Europa, China, Japón, África y América, siendo notificado en diferentes especies animales como bovinos, ovinos, búfalos de agua, equinos, caninos, camélidos, entre otros (Dubey *et al.*, 2007)” (Jara 2009: 7).

“Los valores de seroprevalencia obtenidos varían de acuerdo al país, región, técnica diagnóstica, punto de corte, tamaño de muestra seleccionado, características del muestreo, tipo de explotaciones con o sin antecedentes de sufrir pérdidas reproductivas” (Granados 2012: 18). Las prevalencias de *Neospora caninum* en ovinos, varía en muchos países como Inglaterra con 0,45% (Helmick *et al.*, 2002), Nueva Zelanda con 0,63% (Reichel *et al.*, 2008), Italia con 2% (Gaffuri *et al.*, 2006), Australia con 2,2% (Bishop *et al.*, 2010), Eslovaquia con 3,7% (Spilovská *et al.*, 2009), España con 10,1% (Panadero *et al.*, 2010), Suiza con 10,3% (Hässiget *et al.*, 2003), Brasil con 12% (Silva *et al.*, 2011).

En el Perú, hay varios estudios realizados sobre el *Neospora caninum*, siendo uno de ellos el realizado en el departamento de Junín encontrándose en llamas de la sociedad agrícola de interés social (SAIS) Pachacútec, con una seroprevalencia de 2,9% (Casas *et al.*, 2006) y en ganado bovino de la SAIS Pachacútec una seroprevalencia de 13,2 % (Puray *et al.*, 2006). Otros estudios realizados en el valle del Mantaro en bovinos lecheras encontraron seroprevalencia de 46,7% (Granados *et al.*, 2014).

1.4.6. Transmisión

En la actualidad se han descrito dos formas de transmisión del *Neospora caninum*, la vertical y horizontal, siendo la vertical la principal ruta de transmisión, eficiente y más frecuente en el ganado bovino (Dubey *et al.*, 2003)

Transmisión vertical

La principal ruta de transmisión estudiada en bovinos es la placentaria, como ya se ha mencionado: eficiente y más frecuente: en una hembra gestante los taquizoítos atraviesan la placenta e invaden el feto, detectándose porcentajes de transmisión que van entre el 40% y el 95% (Dubey *et al.*, 2007), con gran importancia en el mantenimiento y propagación de la enfermedad en el hato, sin ser necesaria la dispersión de un hospedador definitivo (Schaes *et al.*, 1999). Las hembras congénitamente infectadas pueden transmitir la infección por varias gestaciones, sin embargo, la tasa de transmisión se va reduciendo con el tiempo por el desarrollo de inmunidad (Anderson *et al.*, 1995).

Un estudio en 1999 demostró la transmisión transplacentaria en fetos de ovejas con infección latente y encontraron que las lesiones histopatológicas presentes en los tejidos fetales, eran causados por *Neospora caninum* (Buxton *et al.*, 2001). Otros estudios en ovinos, también han relatado la transmisión transplacentaria (Kobayashi *et al.*, 2001; Hässig *et al.*, 2003).

La transmisión transplacentaria se da tanto en animales que han abortado como en aquellos que no han mostrado la patología abortiva (Dubey y Lindsay, 1996). Se ha manifestado en el ganado bovino, ovino (Dubey y Lindsay, 1990; McAllister *et al.*, 1996; Buxton *et al.*, 1998), caprino (Lindsay *et al.*, 1995), y canino (Dubey *et al.*, 1996).

La transmisión transplacentaria puede ser endógena o exógena (Trees y Williams, 2005). La transmisión transplacentaria endógena se presenta en las hembras infectadas de manera crónica durante la gestación, esto se relaciona con un

modelo frecuente de abortos, siendo baja la tasa de aborto que se manifiesta a lo largo de meses y años (Schaes *et al.*, 2001). Por el contrario, la transmisión transplacentaria exógena se presenta en bovinos hembras gestantes que son infectadas por primera vez en este periodo mediante una transmisión horizontal; en este caso, la infección se transmite a la progenie, relacionada con abortos de patrón epidémico y tasas de aborto superiores al 10-12,5% en tiempos menores a 6 a 8 semanas (Dijkstra *et al.*, 2001; Schaes *et al.*, 2005).

Se ha demostrado de manera experimental que la transmisión vertical por vía calostro en el ganado bovino, durante el periodo neonatal, es posible (Uggla *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 2001), pero no ha sido demostrado de manera natural.

En ovinos, esta forma de transmisión también fue reportada (Silva *et al.*, 2013) y causa abortos, mortalidad neonatal por partos prematuros, reabsorción embrionaria y nacimiento de crías con insuficiencias neuromusculares en bovinos y ovinos, con el lógico impacto negativo sobre el desenvolvimiento reproductivo de los hatos (Dubey, 2003).

Transmisión horizontal

La transmisión horizontal en los hospederos definitivos, se sabe que ocurre tras la ingesta de un quiste del hospedador intermediario que contiene bradizoítos, mayormente en tejido nervioso como cerebro y médula. Los bradizoítos contenidos en los quistes pueden conservar su capacidad infectante durante largos periodos de tiempo (Bergeron *et al.*, 2001). Otra forma de transmisión natural se da por ingerir tejidos fetales abortados o placentas que presenten quistes tisulares de hospederos intermediarios (Dijkstra *et al.*, 2002).

La transmisión horizontal en los hospederos intermediarios puede ser directa, como la ingesta de ooquistes esporulados de *Neospora caninum* eliminados en las heces del perro o a través de pastos y/o agua contaminada con ooquiste (De

Marez *et al.*, 1999; Trees *et al.*, 2002). En los hatos se ha demostrado la eficiencia de la transmisión vertical, pero la infección no se mantendría a niveles constantes si no hubiera cierto nivel de transmisión horizontal postnatal (Davison *et al.*, 1999). También se han descrito otras vías de transmisión en los hospederos intermediarios, aunque de baja transmisión natural, como la venérea, que puede ser posible, pero es incierta, en las vacas infectadas por experimentos de inoculación intrauterina a partir del semen contaminado con taquizoítos (Serrano *et al.*, 2006).

1.4.7. Patogenia

Los taquizoítos tienen la capacidad de poder invadir células de diversidad de tejidos. Experimentalmente, pueden ingresar a la célula del hospedador a través de proteoglicanos de superficie (Neguleswaran *et al.*, 2002), en un tiempo aproximado de 5 minutos y ubicándose en el citoplasma, en el interior de la vacuola parasitófora, dando inicio a la multiplicación por endogamia, pudiendo una célula albergar 100 parásitos (Pérez *et al.*, 1999). La multiplicación activa resulta en la ruptura de la célula hospedadora y en la necrosis del tejido invadido. Esto genera una respuesta del huésped, una infiltración no purulenta aguda, que se encuentra alrededor del área de necrosis, este proceso con el tiempo genera la proliferación del tejido conectivo en la zona (Pérez *et al.*, 1999). Según el tejido lesionado, lo cual puede ser nervioso, muscular o tejido placentario, se manifestarán los signos clínicos.

En el sistema nervioso central (SNC), el parásito llega a invadir neuronas y astrocitos, llegando también afectar nervios craneales y espinales, generando la interrupción de la transmisión del impulso nervioso, teniendo como consecuencia trastornos neuromusculares (Pérez *et al.*, 1999). En caninos que presentaron signos clínicos, se encontró al parásito en el SNC afectando en su mayoría al cerebro, los taquizoítos se encuentran en mayor frecuencia en la musculatura estriada esquelética y el corazón (Barber *et al.*, 1996).

Patogenia del aborto

La consecuencia más estudiada y de mayor importancia de la infección por *Neospora caninum* en los bovinos es el aborto o el nacimiento de terneros infectados congénitamente. Son varios los factores que contribuyen al progreso del aborto: el instante de la gestación en que se origina la parasitemia (Buxtom *et al.*, 2002), “la magnitud y duración de la parasitemia, de la eficacia de la respuesta inmune maternal, [la capacidad del feto de poder generar una respuesta inmune] y de las características del aislado [de *Neospora caninum*] (...) (Innes *et al.*, 2007)” (Collantes 2003: 32).

En las hembras gestantes, los bradizoítos alojados en los quistes tisulares del SNC pueden volver a activarse si se dan ciertas condiciones hormonales e inmunológicas dando inicio a una parasitemia (Innes *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2002). Iniciada la parasitemia, sea por reactivación de quistes latentes o como consecuencia de una infección externa (Williams *et al.*, 2000), tras la ingesta de quistes esporulados, los esporozoitos se desprenden en el intestino delgado, llegando a parasitar el epitelio, transformándose en taquizoítos. Estos son los responsables de la fase aguda de la infección, dando paso a la etapa de multiplicación rápida en los linfonódulos mesentéricos y que posteriormente se liberan al torrente sanguíneo, alcanzando diferentes tejidos (Dubey *et al.*, 2006). Los taquizoítos, al estar presentes en los tejidos, se multiplican intracelularmente por endodiogenia (Dubey y Lindsay, 1996). Cuando estos migran al epitelio uterino y atraviesan la placenta, generan vasculitis, trombosis y necrosis en el placentoma, llegando también por vía sanguínea al feto (Dubey, 2003).

En la primera etapa de la gestación, la infección por *Neospora caninum* produce la muerte del feto, o su reabsorción, ya que su sistema inmune no está del todo desarrollado. Si la infección se presenta en el segundo tercio de la gestación, se producirá el aborto debido a que el feto tiene una respuesta inmune básica e insuficiente para prevalecer sobre la infección (Gonzales *et al.*, 1999), o puede llegar al nacimiento generando terneros congénitamente infectados que pueden presentar sintomatología aparente. Cuando la infección se da en el tercio final de

la gestación nacerán terneros infectados, pero clínicamente sanos (Buxton *et al.*, 2002).

Estudios realizados tanto en infección natural (Bar *et al.*, 1991) como en infecciones experimentales en bovinos (Barr *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2000, 2003), demuestran que la transmisión del parásito es menos probable al inicio de la gestación, y si se produce trae como consecuencia la muerte fetal seguida de una posterior reabsorción.

La neosporosis en ovinos es menos relevante que en los bovinos. Sin embargo, en predios en los que se crían conjuntamente, los ovinos pueden, eventualmente, sufrir la epidemia de la infección (Vogel *et al.*, 2006).

1.4.8. Inmunidad

Inmunidad en la gestación

Durante la gestación, se mantienen altos los niveles de progesterona y se da una respuesta inmune Th2 (mediada por linfocitos helper tipo 2), lo cual mantiene la gestación a través de la producción de IL4 (interleuquina 4), IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10 y una reducción de moléculas pro-inflamatorias como IL-12 e IFN- γ (interferón gamma), ya que estas son perjudiciales en la gestación (Clark *et al.*, 1999). El rechazo del feto se puede dar por un desbalance entre la respuesta entre Th1 y Th2, en donde Th1 favorece la producción IFN- γ y otras citoquinas asociadas a este tipo de respuesta (Granados 2012) como “[l]as interleuquinas IL-2, IL-3 y IL-12, [que] promueven actividades citolíticas en macrófagos y NK (*natural killer*), activan la protrombina facilitando la coagulación y la trombosis y estimulan la producción de inmunoglobulinas que activan la cascada del complemento. [Procesos patológicos] que promueven una respuesta TH1 alteran el sincitiotrofoblasto. Más aún, el INF- γ es capaz de actuar directamente sobre este tejido, induciendo abortos espontáneos (Moore *et al.*, 2005)” (Granados 2012: 30).

Inmunidad en las infecciones por *Neospora Caninum*

La respuesta inmunológica frente a *Neospora caninum* se da en los primeros momentos tras la infección. Siendo la primera respuesta la inmunidad innata, la cual es llevada por las células dendríticas, células *natural killer* y macrófagos, las cuales responderán liberando citoquinas de tipo IL-12 e INF- γ (Boysen *et al.*, 2006; Strohbusch *et al.*, 2009). “[R]esulta de interés el papel del óxido nítrico (ON), producido por macrófagos activados, que tiene diversas funciones entre las cuales se mencionan la inmunosupresión y la destrucción de parásitos intracelulares, observando que ratones deficientes en óxido nítrico sintetasa, enzima que produce ON, son susceptibles a *Neospora caninum* (Tizard, 2009; Tanaka *et al.*, 2000)” (Jara, 2009: 18-19).

Las infecciones parasitarias generan diferentes tipos de respuesta inmune de tipo celular según el tipo de parásito, los parásitos extracelulares inducen una respuesta del tipo Th2 produciendo IL-4, IL-5, IL6, IL-9, IL-10, IL-13, IgG1, e IgE; en cambio los parásitos intracelulares estimulan una respuesta inmune del tipo Th1 donde predomina la producción de IL-12, INF- γ , TNF (Factor de necrosis tumoral) e IgG2 (Tizard, 2009). En las infecciones naturales y experimentales de animales a partir de los taquizoítos u ooquistes de *Neospora caninum*, la respuesta de la IgG se inclina a incrementar con el curso de la infección, lo que permite identificar animales crónicos o recientemente infectados (Baszlert *et al.*, 1999).

Neospora caninum estimula una respuesta inmune Th1, la cual es mediada por IL-12, con la producción de INF- γ , IL-2, TNF- α “y la presencia de células NK también productoras de INF- γ . Estos linfocitos Th1 son activados por epítopes expresados en la superficie de las células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas), asociados a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II, promoviendo la respuesta citolítica y la inmunidad celular mediada por anticuerpos; asimismo, cuando las proteínas antigénicas se procesan en el

interior de las células, los epítopes también son presentados a los linfocitos citotóxicos (Lc) asociados a moléculas de CMH-1 (Hemphill *et al.*, 2006)” (Jara, 2009: 18).

La importancia del IFN- γ se ha puesto en manifiesto en varios estudios *in vitro* e *in vivo*, en los cuales se demostró el papel importante en el control de la infección por *N. caninum*, mediante el tratamiento de fibroblastos con INF- γ recombinante, lo que causó “una significativa inhibición de la multiplicación intracelular de *N. caninum*, además, se comprobó un aumento de INF- γ después de la infección experimental en bovinos, asimismo, el cultivo de células de cerebro bovino, que es altamente susceptible a la infección por *Neospora caninum*, puede ser inhibida por adicción de IFN- γ y FNT (Innes *et al.*, 1995; Yamane *et al.*, 2000)” (Jara, 2009: 18).

Ha quedado demostrada la intervención de los linfocitos CD4+ y CD8+ en la producción de IFN- γ en los primeros estadios de la infección, mientras que solo los CD4+ prevalecen en las etapas más avanzadas (Marks *et al.*, 1998; Tuo *et al.*, 2005; Klevar *et al.*, 2007), siendo las células T CD4+ posibles mediadoras de la lisis inmediata de células enfermas (Staska *et al.*, 2003).

En las primeras fases de la infección, el IFN- γ activa las células T CD4+ direccionando la réplica inmunitaria hacia un tipo Th1, a la vez activando los linfocitos T CD8+. Este último desempeña un rol vital durante la fase aguda, ya que actúa como células citotóxicas, frenando la propagación del parásito (Ritter *et al.*, 2002; Spencer *et al.*, 2005). En cambio, en etapas más avanzadas, los linfocitos T CD4+ tienen más importancia en la protección frente a *Neospora caninum*. En un estudio con ratones infectados con *Neospora caninum*, se les dio un tratamiento con anticuerpos monoclonales anti CD4+, los cuales presentaron una alta morbilidad y mortalidad; en cambio, los que fueron tratados con anti-CD8+, solo tuvieron una mortalidad del 30% (Tanaka *et al.*, 2000; Nishikawa *et al.*, 2001).

1.4.9. Signos clínicos

Signos clínicos en los perros

La neosporosis clínica en perros se puede presentar desde los 2 primeros días de vida (Barber *et al.*, 1996), las manifestaciones clínicas de déficit neurológico y las alteraciones musculares son los que más predominan (Cornejo 2004).

En los cachorros infectados congénitamente, se puede observar las manifestaciones más graves, por lo general animales menores de 6 meses de edad; observándose parálisis ascendente de los miembros con atrofia y rigidez muscular gradual (Dubey y Lappin., 2000).

Signos clínicos en ovinos y otras especies

El aborto en el bovino se puede presentar “entre el 3^o y el 9^o mes de gestación, pero es más frecuente entre los 4-6 meses (Lindsay *et al.*, 1996). No se detectan signos clínicos previos al aborto. Los fetos generalmente se presentan autolíticos y en ocasiones con grados variables de momificación (Bildfel *et al.*, 1994)” (Cornejo, 2004: 23); en cambio, aquellos fetos que mueren antes del 5^{to} mes de gestación pueden momificarse y quedar retenidos en el útero hasta el término de la gestación (Pérez *et al.*, 1999). Por el contrario, si la muerte ocurre en los primeros meses de gestación, se puede dar la reabsorción seguida por un nuevo celo (Barr *et al.*, 1991; Dubey, 2003).

Los animales que nacen vivos, manifiestan los primeros signos clínicos, frecuentemente, a los 4 o 5 días de postparto y hasta 2 semanas (Dubey y Lahunta, 1993; Duivenvoorden y Lusi, 1995). Al examen neurológico puede observarse disminución del reflejo patelar y de la propiocepción (Dubey *et al.*, 2006), también puede producir defectos congénitos como escoliosis, hidrocefalia o estrechamiento del cordón espinal (Barr *et al.*, 1991; Dubey y Lindsay, 1996).

En ovinos se demostró de forma experimental un caso de neosporosis congénita, en el cual el cordero “nació débil, parcialmente atáxico, y murió a la semana de

edad (Dubey y Lindsay, 1990)” (Jara, 2009: 21). En un estudio con ovejas gestantes, se observó la presencia de aborto, fetos momificados, nacidos muertos, nacimiento de crías débiles y el nacimiento de los cachorros clínicamente sanos, pero con infección congénita (McAllister *et al.*, 1996). En otro trabajo experimental, se demostró la ocurrencia de muerte y reabsorción del embrión, y otras fallas reproductivas, según la edad gestacional en la que se infectaron las ovejas (McAllister *et al.*, 1996).

1.4.10. Lesiones

La infección natural o experimental de ovejas con taquizoítos de *N. caninum* tiene cambios patológicos y clínicos similares a las observadas en el ganado bovino (Dubey y Lindsay, 1990). Las lesiones causadas por el *Neospora caninum* son la “muerte celular acompañada por lesiones necróticas visibles en varios días, debido a una activa replicación de los taquizoítos, provocando daños en la conductividad nerviosa-muscular, causado por la destrucción de las células nerviosas, así como daño cerebral y de la médula espinal (Georgieva *et al.*, 2006)” (Jara, 2009: 21-22).

En 1996, en un trabajo con ovejas infectadas experimentalmente se encontraron lesiones histopatológicas como encefalitis multifocal no supurativa, miositis no supurativa, además de placentitis necrotizante no supurativa. Los quistes también fueron encontrados en el SNC de los fetos (McAllister *et al.*, 1996). Otro estudio, un año después, encontró lesiones semejantes a las de estudios previos realizados por histopatología e IHC (Buxton *et al.*, 1997). También se describió lesiones en los cotiledones de la placenta, corazón, pulmón e hígado (Buxton *et al.*, 1998).

En el 2003, se realizó un estudio en ovejas con infección experimental, donde se utilizaron cinco ovejas gestantes de diferentes días de gestación, los corderos a los que se les hizo la necropsia, nacidos de ovejas inoculadas, presentaron alteraciones histopatológicas en el sistema nervioso central, cuya característica era la existencia de formas quísticas del parásito asociado con infiltrado

inflamatorio de tipo mononuclear, áreas de necrosis y, en menor medida, calcificación (Oviedo *et al.*, 2003).

Exámenes histopatológicos reportaron, encefalitis multifocal, nódulos gliales, células mononucleares, inflamatorias y quistes tisulares con numerosos bradizoítos en el cerebro de una oveja preñada asintomática y en el cerebro de los dos fetos, confirmado por IHC (Kobayashi *et al.*, 2001). También se informó, por medio de IHC, de la presencia de quistes de *Neospora caninum* y de lesiones en el cerebro de fetos abortados (Hássig *et al.*, 2003).

Un estudio en una población de ovejas con problemas de aborto en Nueva Zelanda, a través del examen histopatológico, dio a conocer la mineralización multifocal del estroma, como también necrosis e infiltración de neutrófilos en la base de la carúncula materna; los placentomas maternos tenían mineralización granular crónica con pequeñas áreas de necrosis multifocal del epitelio coriónico y maternal, pero ningún quiste de protozoarios se observó en el cerebro del feto, pero a los animales se les realizó ELISA y PCR, lo cual confirmó la infección por *N. caninum* (Howe *et al.*, 2008).

1.4.11. Diagnóstico

“El diagnóstico de la neosporosis canina y ovina requiere de un procedimiento de recolección de información, que empiece con los datos de anamnesis, epidemiología y la observación de signos clínicos y lesiones, [dando] un diagnóstico presuntivo, que debe ser confirmado por exámenes especializados (...) (Dubey, 2003)” (Cornejo, 2004: 27).

Son numerosas las técnicas confiables para investigar la infección por *N. caninum* en casos de aborto bovino, pudiendo ser obtenido principalmente examinando fetos abortados y complementariamente por análisis de anticuerpos del parásito en las madres y sus crías. Para confirmar la situación en un rodeo con relación a abortos debidos a *N. caninum* es necesario aplicar una combinación de técnicas de diagnóstico (Ortega-Mora *et al.*, 2007).

Pruebas serológicas

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

“[IFI] fue el primer test aplicado a la detección de anticuerpos contra *N. caninum* (...) y es considerada la técnica estándar a comparación de otras (Dubey y Lindsay, 1996)” (Fort, 2003: 8). La prueba de IFI utiliza taquizoítos intactos como antígenos detectando principalmente anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes sobre la superficie del parásito (Björkman *et al.*, 1999), teniendo muy poca reacción cruzada con otros tipos protozoos como *sarcocystis spp* (Dubey *et al.*, 1996).

“La IFI sirve para detectar anticuerpos en el suero de un ternero sin mamar calostro, o en el líquido de cavidades de un feto abortado, indicando la infección por *N. caninum* (Barr *et al.*, 1995), no necesariamente probando que el aborto fue ocasionado por *N. caninum* (Paré *et al.*, 1996)” (Rodríguez, 2015: 26).

Enzimoimmunoensayo (ELISA)

“El ELISA ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la neosporosis. [Tiene] la facilidad para procesar un gran número de muestras, una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con la IF, sumado a la falta de subjetividad cuando se emite un resultado, hacen confiable esta prueba (Paré *et al.*, 1997). (...) 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 (...) valor de corte debería ajustarse a cada circunstancia o situación epidemiológica (Dubey *et al.*, 1999)” (Rodríguez, 2015: 26).

ELISA indirecto

Es el tipo de ELISA más utilizado, “el cual emplea antígeno soluble de taquizoíto, mezcla de antígenos intracelulares y de membrana de los diferentes aislados de *N. caninum* BPA1 Y NC-1; puede ser usado con muestra de suero, leche y líquidos fetales para la detección de anticuerpos, además, los resultados pueden ser expresados como valores de densidad óptica (OD), valores porcentuales de positividad (PP), o valores de cociente entre muestra/control positivo (S/P) (Ortega *et al.*, 2006)” (Granados, 2012: 41).

ELISA de avidéz

Este ELISA es una modificación del ELISA indirecto, que permite analizar la avidéz de IgG, esta “prueba de avidéz está basada en el hecho de que el agregado de úrea durante el desarrollo del ELISA disocia las uniones débiles de los anticuerpos, mientras que los anticuerpos con alta avidéz permanecen firmemente acoplados al antígeno, (...) permite distinguir infecciones primarias o recientes (...) de las infecciones preexistentes”. (Rodríguez, 2015: 27).

Inmunoblot (IB)

También llamado electrotransferencia, “es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. (...) 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, el inmunoblot no es utilizado como método habitual de diagnóstico sino como técnica confirmatoria de otras pruebas serológicas (Atkinson *et al.*, 2000; Sónngen *et al.*, 2001)” (Rodríguez, 2015: 27-28), por lo tanto, es usado junto a otros test.

Prueba de aglutinación

“Esta prueba es muy útil porque no requiere de anticuerpos secundarios conjugados” (Rodríguez, 2015: 28) y se usan taquizoítos como antígeno; también es utilizada para el diagnóstico de neosporosis. Packham y colaboradores “desarrollaron un test de aglutinación, el cual fue comparado con IFI y ELISA.

Muestras de sueros procedentes de 16 especies diferentes de animales cuyos diagnósticos habían sido confirmados histopatológicamente fueron testeadas. La prueba de aglutinación dio una mayor sensibilidad (100%) y especificidad (97%) que la prueba de ELISA (74 y 95 %, respectivamente), y tuvo una mayor sensibilidad pero menor especificidad que la IFI (98 y 99%, respectivamente)” (Rodríguez, 2015: 28).

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

“Las técnicas de PCR es útil para detectar el parásito en los tejidos de fetos abortados. Las ventajas de esta técnica son su elevada especificidad y sensibilidad y la capacidad de amplificar pequeñas cantidades de ADN de *Neospora caninum* en una gran variedad de tejidos” (Granillo y Martínez 2008: 45).

1.4.12. Tratamiento

El tratamiento farmacológico de la neosporosis bovina no es posible actualmente por la falta de fármacos eficaces y rentables (Dubey *et al.*, 2011).

Para el tratamiento en caninos como en bovinos “se ha recomendado una terapéutica similar a la utilizada en los casos de toxoplasmosis (*T. gondii*), la cual consiste en el uso de clindamicina oral en dosis de 12,5 a 18,5 mg/kg/p.v. suministrada dos veces por día durante un período de 2 a 4 semanas” (Granillo y Martínez 2008: 49). Al igual, resulta eficaz la asociación “de pirimetamina y sulfonamidas vía oral a dosis de 0,25 a 0,5 y 30 mg/kg/p.v., respectivamente, cada 12 horas por 4 semanas (Cuéllar *et al.*, 2004)” (Granillo y Martínez 2008: 49). En un estudio experimental en terneros con neosporosis se utilizó toltrazuril y ponazuril, derivados de la droga triazinona, utilizada para el tratamiento de coccidiosis, teniendo como resultados la disminución de las lesiones cerebrales causadas por la enfermedad (Moore *et al.*, 2005).

1.4.13. Control

Por lo general, “la neosporosis se presenta como una causa más de aborto [en el ganado] y el control debe ir encaminado, fundamentalmente, a reducir la prevalencia de la infección [en los hatos] con brotes declarados y prevenir su propagación (...) evitando tanto la transmisión horizontal como la vertical” (Collantes, 2003: 67).

Una de las medidas de control es disminuir la infección postnatal tratando de reducir “el riesgo de infección con la ingestión de ooquistes eliminados en las heces del hospedero definitivo, restringiendo el acceso de los perros a las fuentes de agua, pasturas, galpones y silos donde se almacene alimento para los bovinos” (Jara, 2009: 27); también, eliminar los fetos abortados y las placentas evitando de esa manera el foco infeccioso hacia los perros (McAlliester *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 2001).

En el caso del control de la transmisión congénita en un hato, las medidas recomendadas son la identificación de los animales seropositivos, si la serología indica una alta prevalencia del parásito se podría mantener en el hato los animales infectados, pero estos deben estar separados del resto de los animales así como las crías de estos; realizar exámenes antes de la ingesta de calostro; en caso estas crías nazcan sin infección, deberán ser alimentadas con calostro de madres seronegativas y estas crías pueden permanecer en el hato para ser utilizadas como recria. En caso con el control del hato con prevalencia baja, se podría realizar la eliminación de los animales infectados o realizar una separación progresiva de los animales (Thurmond y Hietala, 1995).

1.4.14. Prevención

Vacunación

Una “medida eficaz de la prevención de la transmisión vertical (...) podría ser la inmunoprofilaxis. (...) recientemente se ha descrito una vacuna frente a *N. caninum* que ha tenido escaso éxito (Andrianarivo *et al.*, 2000)” (Álvarez, 2003: 84).

“Las pérdidas reproductivas pueden presentarse más de una vez en gestaciones subsiguientes, [sin embargo] las tasas de repetición de aborto por neosporosis son relativamente bajas (menores al 5 %) (Anderson et al., 1991; Wouda et al 1998)” (Contreras, 2011: 36). En estudios experimentales se ha demostrado la importancia de “inducir una respuesta inmune eficaz de tipo Th1 (...). Sin embargo, una fuerte respuesta tipo Th1 originada como consecuencia de una vacunación podría ser incompatible con el desarrollo de una gestación normal” (Álvarez, 2003: 84).

“[U]na vacuna inactivada (NeoGuar®, Intervet) estuvo aprobada para su uso en vacas gestantes en los Estados Unidos hasta el año 2009. A pesar de ser una vacuna segura, su papel protector frente al aborto fue muy discutido, ya que esta vacuna no confería protección en vacas gestantes infectadas experimentalmente con el parásito (Andrianarivo *et al.*, 2000), y en varios estudios de campo presentó una eficacia variable (5,2%-54%) (Heuer *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2004; Weston *et al.*, 20011)” (Rojo, 2012: 22).

Estudios experimentales realizados con ganado bovino demostraron que el uso de vacunas vivas atenuadas generó protección frente a aborto. “[T]ambién se están dirigiendo [investigaciones] hacia el diseño de vacunas de nueva generación empleando diversos antígenos recombinantes, parásitos transgénicos o nuevas técnicas de adyuvantación (Innes *et al.*, 2011)” (Rojo, 2012: 22).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización y ambiente

El presente estudio se desarrolló en la unidad de producción de Cochas de la SAIS Túpac Amaru, situado a una altura de 4500 m s.n.m. en el distrito de Canchayllo, provincia de Jauja, departamento de Junín, a la altura del km 43 de la carretera central La Oroya-Huancayo.

a. Población y muestra

La población total de ovinos en la SAIS Túpac Amaru es de 81,533 (Informe anual de la SAIS Túpac Amaru), los cuales son manejados en rebaños diferentes según la calidad genética, clasificándolos como de mayor calidad genética hasta una menor calidad genética.

El tamaño de muestra se determinó a una proporción de 13,2% a referencia de esta prevalencia en el área estudiada (Puray *et al.*, 2006). Para lo cual, se utilizó el método de tamaño mínimo muestral para una población conocida, la cual dio como resultado 176 con un nivel de confianza del 95% y un error aceptado de 5%; tamaño mínimo de muestra para proporciones en una población finita (Bejarano *et al.*, 2006).

$$n = \frac{NZ^2 pq}{e^2(N-1) + Z^2 pq}$$

Donde:

n: tamaño de muestra

N: estimación de números de animales en la población

Z: nivel de confianza del 95% (1,96)

p: Prevalencia referencial (Puray *et al.*, 2006).

q: 1-p

e: error máximo admisible 5%

$$n = \frac{(81533) (1,96)^2 (0,132) (1 - 0,132)}{(81533-1) (0,05)^2 + (1,96)^2 (0,132) (1 - 0,132)}$$

n= 176

Este estudio trabajará con 367 animales por disponer de mayor número de muestras y materiales, para poder así obtener mayor confianza en el resultado.

b. Diseño experimental

Este estudio es descriptivo transversal y fue muestreo aleatorio de los ovinos raza Junín teniendo en cuenta la edad y el sexo del animal, de los que se eligió al azar (tabla de números aleatorios) para ser analizados, teniendo un resultado de 367 animales, los cuales fueron rotulados con la identificación, edad, sexo y categoría genética en un registro.

c. Diseños metodológicos

i. Toma de muestra

Se colectó muestras sanguíneas de los animales, estos fueron manipulados según las técnicas de manejo y sujeción para ovinos, realizándose la recolección de las pruebas por venopunción yugular en un tubo Vacutainer de 5 ml sin anticoagulante, se centrifugó a 2500rpm x 5 minutos, se aisló el suero y conservo a -20°C, hasta su procesamiento, los cuales forman parte del banco de sueros del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Científica del Sur.

ii. Procesamiento de muestras

Se empleó la técnica de ELISA indirecto mediante VMRD *Neospora caninum*

Antibody test kit, cELISA, con una sensibilidad de 97,6% y especificidad del 98,6%, para detección de anticuerpos, el cual contiene un conjugado antibovino (Baszler *et al.*, 2001).

Se preparó los controles positivos y negativos, se cargó el control positivo y negativo por duplicado y las muestras se utilizaron sin diluirse. Se preparó las placas y se retiró de la bolsa de aluminio. Se preparó 1X conjugado anticuerpo-peroxidasa mediante la dilución de 1 parte del conjugado anticuerpo-peroxidasa 100X (D) con 99 partes de tampón de dilución conjugado (E). La solución 1X de lavado se preparó diluyendo la solución de lavado 10X de concentrado con 9 partes de agua destilada o desionizada. Se necesitaron aproximadamente 1,5 ml por pocillo.

Se inició el procesamiento, calibrando una micropipeta a 50 μ l, se cargó los controles y las muestras de suero en cada pocillo de la placa que estaba recubierta de antígenos (A) lo más rápido posible. Se cubrió la parte superior de la placa y se incubó la placa por 1 hora a temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Después de 1 hora de incubación se lavó las placas 3 veces, se procedió a voltear y retirar el suero y los controles restantes golpeando fuertemente la placa invertida 4 veces en papel toalla limpia. Inmediatamente se llenó cada pocillo con la solución de lavado utilizando un dispositivo de llenado multicanal, luego se retiró la solución y este procedimiento se repitió 2 veces adicionales, dando un total de 3 lavados.

Se añadió 50 μ l del diluido (1X) conjugado de Antibody-peroxidasa a cada pocillo. Se incubó durante 20 minutos adicionales a temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Después de incubar por 20 minutos se procedió con 3 lavados de la misma forma que se mencionó anteriormente.

Luego se añadió 50 µl de la solución sustrato (G) en cada pocillo, se tiene que realizar pequeños golpecitos para asegurar que la capa de sustrato se encuentre en el fondo del pocillo. Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) evitando la luz solar.

Se añadió 50 µl de la solución Stop (H) a cada pocillo y se dio un pequeño golpecito para asegurar la mezcla de la solución de sustrato y la solución de Stop. Inmediatamente después de añadir la solución Stop, la placa se leyó en un espectrofotómetro de absorbancia de microplacas. Finalmente, se ajustó la densidad óptica (DO) de longitud de onda de lectura de 650 nm en blanco para poder leerlo (Baszler *et al.*, 2001).

Interpretación

Para la presentación del resultado se utilizó el cociente (%I):

$$\%I = 100 [1 - (\text{muestra D.O} / \text{NC O.D})]$$

Para lo cual primero se realizará el cálculo del porcentaje de inhibición, luego se realizará el test de validación de los controles donde la media del control negativo D.O debe ser $\geq 0,30$ y $< 2,50$, y la media del control positivo D.O debe ser $\geq 30\%$ de inhibición.

Si la muestra de ensayo produce una inhibición de la aglutinación (antígeno-anticuerpo) $> 30\%$, es positivo; y si la muestra problema es $< 30\%$ de inhibición, será considerado negativo, según el manual de procedimientos del kit comercial en mención.

Análisis de datos

Los resultados obtenidos serán presentados en tablas de frecuencia y expresados en porcentaje, con sus respectivos intervalos de confianza, lo que nos permitirá la determinación de prevalencias mínimas y máximas, vinculadas a las variables

evaluadas. Se determinará la asociación estadística ($p < 0,05$) entre la positividad a anticuerpos contra *Neospora caninum*, frente a las variables sexo, y edad.

Se utilizó la simulación Beta PERT de distribución estocástica con el programa para análisis de riesgo @Risk 5.5® (100 interacciones), con el fin de obtener una curva de distribución de la proporción de resultados positivos a *Neospora caninum*.

IV. RESULTADOS

Se evaluaron 367 muestras sanguíneas de ovinos (*Ovis aries*) recolectadas de la Unidad de Producción de Cochas de la SAIS Túpac Amaru en Junín – Perú. Se determinó la prevalencia de 0,82% (3/367) con un IC_{95%}: 0% - 1,74% de animales seropositivos a anticuerpos contra *Neospora caninum* (Cuadro1).

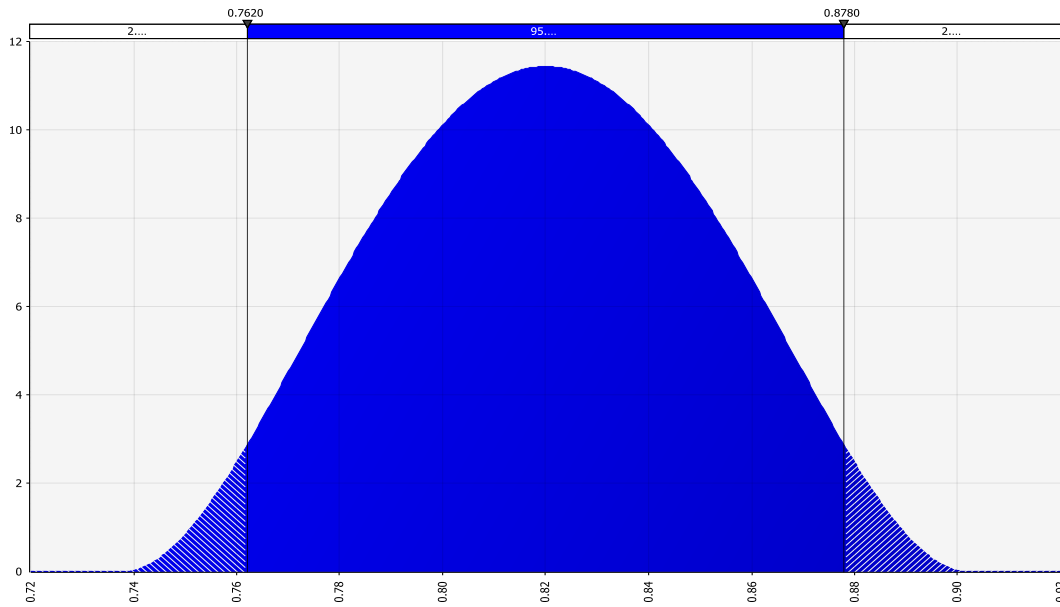
El resultado obtenido fue de 1,1% (3/367) de ovinas hembras para variable sexo; el porcentaje de suero positivo de 4 años de edad fue de 2,1% (3/367); En relación a la variable calidad genética se obtuvo para la categoría A: 1,1% (1/367), categoría B: 1,7% (2/367); sin que para ninguno se haya determinado una asociación estadística ($p > 0,05$) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Determinación de seropositivos contra *Neospora caninum* según sexo, edad y clase en ovinos de la SAIS Túpac Amaru (n=367)

| | | Positivos | Total | Porcentaje | Min | Max | Valor p |
|-------|--------|-----------|-------|------------|-------|-------|---------|
| Sexo | Macho | 0 | 91 | 0,0% | 0,00% | 0,00% | 0,318 |
| | Hembra | 3 | 276 | 1,1% | 0,00% | 2,31% | |
| Edad | 2 años | 0 | 37 | 0,0% | 0,00% | 0,00% | 0,101 |
| | 3 años | 0 | 184 | 0,0% | 0,00% | 0,00% | |
| | 4 años | 3 | 146 | 2,1% | 0,00% | 4,36% | |
| TOTAL | | 3 | 367 | 0,8% | 0,00% | 1,74% | |

Gráfico 1. Curva de distribución beta pert para la proporción de *Neospora caninum* en ovinos de la SAIS Túpac Amaru. Mediante el programa de análisis de riesgo @Risk 5.5®

Se realizaron 100 interacciones, para establecer la prevalencia mínima y máxima de 0,7620% y 0,8780%, respectivamente (n=367).



| | |
|--------------------------|--------|
| Pert (0,738,0,82,0,0902) | |
| Minimun | 0,7380 |
| Maximun | 0,9020 |
| Mean | 0,8200 |
| Std Dev | 0,0310 |

V. DISCUSIÓN

El resultado del presente estudio evidenció la presencia de ovinos positivos a anticuerpos contra *Neospora caninum* en un 0,82% (3/367) de las muestras evaluadas. Estudios previos, reportan prevalencias de anticuerpos contra *Neospora caninum* con una amplia distribución a nivel mundial, afectando diferentes especies animales como bovinos, llamas, alpacas y ovinos con índices entre 2,6 % y 68,7% (Chávez *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2007; Granados *et al.*, 2014). Sobre la neosporosis, existen diferentes estudios que evidencian la existencia de anticuerpos contra el parásito en ovinos, siendo la prevalencia obtenida en este estudio (0,82%) menor a la reportada en Italia con 2% con la técnica ELISA (Gaffuri *et al.*, 2006), en el sur de Brasil con 3,2 % usando la técnica ELISA (Vogel *et al.*, 2006), en el estado de Paraná con 9,5% (Romanelli *et al.*, 2007) a través de la técnica IFI, en Suiza con 10,3% con la técnica IFI (Hässig *et al.*, 2003) y también en Pakistán 27,7% con la técnica ELISA (Nasir *et al.*, 2012). Por lo que al existir reportes de anticuerpos contra *Neospora caninum* en ovinos de varias partes del mundo, se hacen necesarios estudios en el país que permitan evidenciar una prevalencia oficial de esta enfermedad, como herramienta para la toma de decisiones de programas de prevención y control en las regiones y a nivel nacional.

A nivel nacional, se ha detectado la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en la sierra central del Perú (2002), obteniéndose 18.4% en alpacas y llamas, siendo este el primer reporte para estas especies (Chávez *et al.*, 2002); también se obtuvo (2.9%) en llamas hembras de la SAIS Pachacútec, caracterizada por ser un sistema de crianza extensiva pero separado por especies; siendo este último, más bajo que el anterior estudio (Casas *et al.*, 2006); Otro estudio reportó 13.2% de positivos, realizado también en ganado de la SAIS Pachacútec (Puray *et al.*, 2006), y finalmente un último reporte obtuvo 46,7% en bovinos lecheros en el valle del Mantaro (Granados *et al.*, 2014). La baja prevalencia reportada en el presente

estudio, puede deberse a la baja exposición de pastos, forrajes y agua contaminados por los ooquistes infectivos; el tiempo de sobrevivencia de los ooquistes en el medio ambiente, aunque esto no se conoce con exactitud. Asimismo, se supone que poseen similar resistencia a los de *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2004), pero se sabe que las bajas temperaturas y la humedad favorecen la esporulación y la supervivencia de estos ooquistes (Dubey *et al.*, 2007). Presumir

Para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* se usa la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA; la IFI es considerada la técnica estándar, pero la prueba de ELISA utilizada en el presente estudio, es recomendada sobre todo para estudios epidemiológicos porque permite su aplicación en un gran número de muestras con una sensibilidad del 97,6% y una especificidad del 98,6%; y no son dependientes de la subjetividad en la interpretación, como sucede con el IFI (Baszler *et al.*, 2001; Ahmad *et al.*, 2011). Además, varios estudios determinaron una concordancia (0,98%) casi absoluta descrito por la índice kappa entre las técnicas IFI y ELISA (Serrano *et al.*, 2018). Por lo que, estas pruebas podrían utilizarse indistintamente para el diagnóstico de la infección por *Neospora caninum*. La prevalencia obtenida en este estudio 0,82% (3/367) es más baja que la obtenida en Australia con 2,2% (5/232) (Bishop *et al.*, 2010), en el norte de España 10,1% (18/177) (Panadero *et al.*, 2010) y también menor a la obtenida en República Checa 11,5% (63/547) (Bartová *et al.*, 2009), todos estos estudios fueron realizados en ovinos con la prueba VMRDs *N. caninum* cELISA antibovino, que demuestra ser una prueba confiable.

El presente estudio no encontró una asociación significativa ($p > 0,05$) entre la seropositividad y la edad o sexo de los animales, similar a reportes de otros estudios (Figliuolo *et al.*, 2004; Romanelli *et al.*, 2007; Spilovská *et al.*, 2009), indicando la presencia homogénea del agente en el rebaño, esto puede sugerir que la transmisión vertical es posible; como datos experimentales y de campo, se ha demostrado una transmisión vertical del *Neospora caninum* en ovinos (Gonzales *et al.*, 2014; Hássig *et al.*, 2003; Jolley *et al.*, 1999). En la transmisión

horizontal los perros son epidemiológicamente importantes (Dubey *et al.*, 2007), también existe evidencia de una relación entre la infección de este protozooario en perros y ganado (Wouda *et al.*, 2000); Además, se sabe que la transmisión horizontal en ovinos por la ingesta del ooquiste esporulado en alimentos contaminados con heces de perro, no es una ruta principal (Hássig *et al.*, 2003).

En el Perú, se reportan variadas prevalencias de *N. caninum* en bovinos, como el 57% de 104 muestras evaluadas en Arequipa (Andresen, 1999); en Lima 29,6% en 304 muestras (Silva *et al.*, 2002); en Cajamarca 45,95% en 74 muestras (Escrura, 2003); Junín 12,8% de 347 muestras y 46,7% de 182 muestras (Puray, 2006; Granados *et al.*, 2014). En ovinos, para nuestro país, es necesaria la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum*, en distintas regiones para diagnosticar este parásito en otras explotaciones ovinas; además, se deben tomar las medidas necesarias para evitar la infección, ya sea controlando la población de caninos (hospederos definitivos) (Granados *et al.*, 2011), mejorando la eliminación de restos de origen reproductivo (placenta, fetos abortados, secreciones, entre otros) y evitando la contaminación del alimento con quistes de tejidos u ooquistes esporulados como formas infectivas de la parasitosis en estudio (Bergeron *et al.*, 2001).

VI. CONCLUSIONES

Existe presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en ovinos de la SAIS Túpac Amaru con una prevalencia de 0,82% (3/367).

Estadísticamente no es significativa la asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* y el sexo o edad.

VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda que se realicen más estudios que asocien la presencia de la infección, en diferentes regiones del país, con el fin de detectar este parásito en explotaciones ovinas.

Asimismo, determinar los factores de riesgo para cada tipo de crianza ovina en las diferentes condiciones ambientales y altitudinales.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Shehada N., Abu-Halaweh M. Flock-level seroprevalence of, and risk factors for, *Neospora caninum* among sheep and goats in northern Jordan. *Prev Vet Med.* 2010; 93(1): 25-32.
- Ahmad N., Jozani J., Neda Z. Adaptation of Dot-Elisa for Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infestation in Aborted Cows. *Global Veterinaria* 2011; 7(2):149-152.
- Álvarez García G. Identificación y caracterización de antígenos de “*Neospora Caninum*” con interés inmunodiagnóstico en bovinos. Memoria presentada para optar el grado de Doctor. 2003. Universidad Complutense de Madrid.
- Andresen H. Neosporosis en el Perú y el mundo. *Rev Cien Vet Perú.* 1999; 15(4): 11-16.
- Aliaga J. Posibilidades del desarrollo de la crianza ovina en el Perú. Conferencia Cuzco. 2009: 1-17.
- Allen G. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2 vol. 5th Ed. 2004.
- Andrianarivo A., Rowe J., Barr B., Anderson M., Packham A., Sverlow K., Choromanski L., Loui C., Grace A., Conrad P. A POLYGEN-adjuvanted killed *Neospora caninum* tachyzoite preparation failed to prevent foetal infection in pregnant cattle following i.v/i.m. experimental tachyzoite challenge. *Int. J. Parasitol.* 2000; 30(9): 985–990.
- Anderson M., Blanchard P., Barr B., Dubey J., Hoffman R., Conrad P. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1991; 198 (2): 241-244.
- Anderson M., Palmer C., Thurmond M., Picanso J., Blanchard P., Breitmeyer R., Layton A., McAllister M., Daft B., Kinde H. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1995; 207(9): 1206- 1210.

- Atkinson R., Harper P., Reichel M., Ellis J. Progress in the Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infections of Cattle. *Parasitol Today*. 2000; 16(3): 110-114.
- Barber J., Payne-Johnson C., Trees A. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *Journal of Small Animal Practice*. 1996; 37(12): 568-574.
- Barr B., Conrad P., Dubey J., Anderson M. Neospora-like encephalomyelitis in a calf pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J. Vet. Diagn. Invest*. 1991; 3(1): 39-46.
- Barr B, Anderson M, Woods L, Dubey J, Conrad P. Neospora-like protozoal infectious associated with abortion in goats. *J Vet Diagn Invest* 1992; 4(3):365-367.
- Barr B., Conrad P., Sverlow K., Tarantal A., Hendrickx A. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab. Invest*. 1994; 71(2): 236–242.
- Barr B., Anderson M., Sverlow K., Conrad P. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec*. 1995; 137(24): 611-613.
- Barber J., Payne-Johnson C., Trees A. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical neosporosis. *J Small Anim Pract*. 1996; 37(12): 568-574.
- Baszler T., Long M., McElwain T., Mathison B. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol*. 1999; 29 (10): 1635-1646.
- Baszler T., Adams S., Vander-Schalie J., Mathison B., Kostovic M. Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J. Clin. Microbiol*. 2001; 39(11): 3851- 3857.
- Bejarano B., Mormontoy L., Tipacti C. Muestreo e inferencia Estadística en ciencias de la Salud. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Editorial Imprenta Unión. 2006, p. 85.

- Bergeron N., Fecteau G., Villeneuve A., Girard C., Pare J. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 2001; 97(2): 145-152.
- Bishop S., King J., Windsor P., Reichel M., Ellis J., Slapeta J. The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. *Vet. Parasitol.* 2010; 170: 137-142.
- Bildfell B., Davidson J., Dubey J. *Neospora* induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. *Can. Vet. J.* 1994; 35(2): 122.
- Bjerkas I., Mohn S., Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd.* 1984; 70(2): 271-274.
- Bjerkas I., Presthus J. The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoan in dogs. *APMIS.* 1989; 97(5): 459-468.
- Björkman C., Uggla A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol.* 1999; 29: 1497-1507.
- Boysen P., Klevar S., Olsen I., Storset A. The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. *Infect Immun.* 2006; 74 (2): 953-960,
- Buratovich O., Villa M. Produccion intensiva de carne ovina en la precordillera del Chubut. *Ovinos Ediciones. INTA.* 2004: 163-169.
- Buxton D., Maley S., Thomson K., Trees A., Innes E. Experimental Infection of Non-pregnant and Pregnant Sheep with *Neospora caninum*. *J Comp Pathol.* 1997; 117(1): 1-16.
- Buxton D., Maley S., Wright S., Thomson K., Rae A., Innes E. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. *J Comp Pathol.* 1998; 18(4): 267-279.
- Buxton D., Wright S., Maley A., Rae A. Lundén. Immunity to experimental neosporosis in pregnant sheep. *Parasite immunol.* 2001; 23(2): 85-91.
- Buxton D., McAllister M., Dubey J. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 2002; 18(12):546-552.

- Casas G., Chávez A., Casas E., Leyva V., Alvarado A., Serrano E. Presencia de *Neospora caninum* en llamas de una empresa ganadera de la sierra central. *Rev. Inv. Vet. Perú* 2006; 17(1): 8-13.
- Chávez A., Serrano E., Casas E., Ortega L. *Neospora caninum* en camélidos sudamericanos peruanos. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 2002; 13(1): 92-93.
- Clark D., Arck P., Chaouat G. Why did your mother reject you? Immunogenetic determinants of the response to environmental selective pressure expressed at the uterine level. *Am J Reprod Immunol*. 1999; 41(1): 5-22.
- Clark D., Croitoru K. Th1/Th2, 3 imbalance due to cytokine-producing NK, gamma delta T and NK-gamma-delta T cells in murine pregnancy decidua in success or failure of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2001; 45(5): 257-265.
- Collantes Fernández E. Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental. Memoria para optar el grado de doctor. 2003. Universidad Complutense de Madrid.
- Contreras Calisana E. Seroprevalencia de *Neospora Caninum* en vacunos lecheros del distrito de Inclan del valle de Sama región Tacna - 2009. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista. 2011. Universidad Jorge Basadre Grohmann.
- Cordero M., Hernández S., Martínez J., *et al*, Parasitología veterinaria, McGraw-Hill interamericana. Madrid, España 2000; 1: 330-332.
- Cornejo Prado N. J. Seroprevalencia de *N. Caninum* en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del valle del Mantaro. Tesis para optar el título profesional de médico veterinario. 2004. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Cuéllar K., López C., Romero L. Evidencia Serológica de *Neospora caninum* en vacas con historial de abortos en once ganaderías lecheras de la zona Centro-Occidental de El Salvador: Tesis. Lic. Med. Vet. San Salvador, El Salvador. 2004.

- Davison H., Otter A., Trees A. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 1999; 29(10):1683-1689.
- Davison H., Guy C., McGarry J., Guy F., Williams D., Kelly D., Trees A. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res Vet. Sci.* 2001; 70 (2): 163-168.
- Díaz R., Oviedo F. Cadena productiva de ovinos, Ministerio de Agricultura y Riego, 2013.
- Dijkstra T., Eysker M., Schares G., Conraths F., Wouda W., Barkema H. 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.* 2001; 31(8):747-752.
- Dijkstra T., Barkema H., Hesselink J., Wouda W. 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.* 2002; 105(2): 89-98.
- Dubey J., Lindsay D. *Neospora caninum* Induced Abortion in Sheep. *J. Vet. Diagn. Invest* 1990; 2(3): 230-233.
- Dubey J., Lahunta A. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Appl Parasitol.* 1993; 34 (4): 229-233.
- Dubey J., Lindsay D. A review of *Neospora caninum* and Neosporosis. *Vet. Parasitol* 1996; 67(1-2): 1-59.
- Dubey J., Jenkins M., Adams D., McAllister M., Anderson-Sprecher R., Baszler T., Kwok O., Lally N., Bjorkman C., Ugglá A. Antibody responses of cows during an outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and different enzyme-linked immunosorbent assays. *J Parasitol.* 1997; 83(6): 1063- 1069.
- Dubey J., Hattel A., Lindsay D., Topper M. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988; 193(10): 1259-1263.
- Dubey J. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology.* 1999; 84(3-4):349-367.

- Dubey J., Lappin M. Neosporosis. En: Enfermedades infecciosas en perros y gatos. Mac Graw Hill- Interamericana, 2000; 2(1): 554-560.
- Dubey J., Barr B., Barta J., Bjerkas I., Björkman C., Blagburn B., *et al.* Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.* 2002; 32(8):929-946.
- Dubey J. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 2003; 41(1): 1-16.
- Dubey J., Sreekumar C., Knickman E., Miska K., Vianna M., Kwok O., Hill D., Jenkins M., Lindsay D., Greene C. Biologic, morphologic, and molecular characterisation of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int. J Parasitol.* 2004; 34(10): 1157-1167.
- Dubey J., Knickman E., Greene C. Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. *Acta Parasitol.* 2005; 50(2): 176-179.
- Dubey J., Buxton D., Wouda W. Pathogenesis of Bovine Neosporosis. *J. Comp. Pathol.* 2006; 134(4):267-289.
- Dubey J., Schares G., Ortega L. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(2):323-367.
- Dubey J., Jenkins M., Rajendran C., Miska K., Ferreira L., Martins J. *et al.* Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 2011; 181(2-4):382-387.
- Duivenvoorden J., Lusi P. *Neospora* abortions in eastern Ontario dairy herds. *Can. Vet. J.* 1995; 36 (10): 623.
- Escurra M. Situación de la ganadería lechera en Cajamarca. *Rev. Inv. Perú.* 2001; 12(2): 21-26.
- Escobar M., Vargas K. Comparación de Inmunofluorescencia indirecta y ELISA para la determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum* en sueros de bovinos recolectados en fincas de la provincia de Pichincha, Bolívar y Santo Domingo de los Tsáchilas 2011.
- Figliuolo L., Kasai N., Ragozo A. de Paula V., Dias R. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in ovine from São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004; 123(3-4): 161-166.

- Ford M. *Neospora caninum*: Estudio seroepidemiológico en bovinos de la provincia de La Pampa. 2003. Argentina: EEA Anguil "Ing. Agr. Guillermo Covas" - INTA.
- Gaffuri A., Giacometti M., Tranquillo V., Magnino S., Cordioli P., Lanfranchi P. Serosurvey of roe deer chamois sheep in the central Italian Alps. *J Wildl Dis.* 2006; 42: 685-690.
- García Z., Cruz C., Medina L., García D., Chavarria B. Serological survey of *Neospora caninum* infection in dairy cattle herds in Aguascalientes. *Vet. Parasitol.* 2002; 106(2): 115-120.
- Georgieva D., Prelezov P., Koinarsky V. *Neospora caninum* and neosporosis a review. *Bulg J Vet Med.* 2006; 9: 1-26.
- Gondim L., Gao L., McAllister M. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J. Parasitol.* 2002; 88(6):1159-1163.
- Gondim L., McAllister M., Pitt W., Zemlicka D. Coyote (*Canis Latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 2004; 34(2):159-161.
- Gonzales M., Castro J., Regidor J., Benavides J., Álvarez G., Fuentes M., Ortega L., Mezo M. *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Vet. Res.* 2014; 45:88.
- González L., Buxton D., Atxaerandio R., Aduriz G., Maley S., Marco J., Cuervo L. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet Rec.* 1999; 144(6): 145-150.
- Granados S. Frecuencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros de cuatro distritos del Valle del Mantaro (Junín). Tesis para optar el título profesional de médico veterinario. 2012. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Granados S., Rivera H., Casas E., Suárez F., Arana C., Chávez A. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros de cuatro distritos del Valle del Mantaro, Junín. *Rev. Inv. Vet.* 2014; 25(1):58-64.
- Granillo G.E. y Martínez J.C. Determinación serológica de *Neospora caninum* en *canis domesticus* en tres ganaderías lecheras del departamento de

- Sonsonate, de El Salvador. Tesis para optar el título de licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2008. Universidad de El Salvador.
- Guy C., Williams D., Smith R., Trees A. Vaccination against *Neospora* - associated abortion in cattle. Proceedings of the 20Th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Christchurch. 2005; 191.
- Hässig M., Sager H., Reitt K., Ziegler D., Gottstein B. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. Vet. Parasitol. 2003; 117(3): 213-220.
- Helmick B., Otter A., McGarry J., Buxton D. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. Res. Vet. Sci. 2002; 72(2): 187-189.
- Hemphill A., Gottstein B., Kaufmann H. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. Parasitology. 1996; 112(2): 183-197.
- Hemphill A., Gottstein B. Identification of a major surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. Parasitol Res. 1996; 82(6): 497-504.
- Hemphill A., Gajendran N., Sonda S., Fuchs N., Gottstein B., Hentrich B., *et al.* Identification and characterisation of a dense granule-associated protein in *Neospora caninum* tachyzoites. Int. J. Parasitol 1998; 28(3): 429- 438.
- Hemphill A., Gottstein B. *Neospora caninum* and neosporosis - recent achievements in host and parasite cell biology and treatment. Acta Parasitológica 2006; 51(1): 15-25.
- Heuer C., Nicholson C., Russell D., Weston J. Efficacy of vaccination against *Neospora caninum* for the prevention of abortion in New Zealand dairy cattle In: Anonymous .Proceedings of the 10th International Symposium on Veterinary Epidemiology and Economics 2003.
- Howe L., Collett M., Pattison R., Marshall J., West D., Pomoroy W. Potential involvement of *Neospora caninum* in naturally occurring ovine abortions in New Zealand. Vet Parasitol. 2012; 185(2-4): 64-71.
- Howe L., West D., Collett M., Tattersfield G., Pattison R., Pomroy W., Kenyon P., Morris S., Williamson N. The role of *Neospora caninum* in three cases of

- unexplained ewe abortions in the southern North Island of New Zealand. *Small Rumin Res.* 2008; 75(2): 115-122.
- [INEI] Instituto nacional de estadística e informática. III Censo Nacional Agropecuario. Lima: Ministerio de Agricultura y Riego; 1994.
- [INEI] Instituto nacional de estadística e informática. IV Censo Nacional Agropecuario. Lima: Ministerio de Agricultura y Riego; 2012.
- Innes E., Panton W., Marks J., Trees A., Holmdahl J., Buxton D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H-uracil. *J Comp Pathol.* 1995; 113(1): 95-100.
- Innes E., Andrianarivo A., Björkman C., Williams D., Conrad P. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 2002; 18(11): 497-504.
- Innes E., Mattsson J. *Neospora caninum* emerges from the shadow of *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 2007; 23(2): 43-44.
- Innes E., Bartley P., Rocchi M., Benavidas-Silvan J., Burrells A., Hotchkiss E., Chianini F., Canton G., Katzer F. Developing vaccines to control protozoan parasites in ruminants: dead or alive? *Vet Parasitol.* 2011; 180 (1-2), 155-163.
- Jara Vila J.A. Determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en el distrito de Jenaro Herrera, Loreto. Tesis para optar el título de médico veterinario. 2009. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Jolley W.R., McAllister M.M., McGuire A.M., Wills R.A. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. *Vet Parasitol.* 1999; 82:251–257.
- King J., Šlapeta J., Jenkins D., Al-Qassab S., Ellis J., Windsor P. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 2010; 40(8):945-950.
- Klevar S., Kulberg S., Boysen P., Storset A., Moldal T., Bjorkman C., Olsen I. Natural killer cells act as early responders in an experimental infection with *Neospora caninum* in calves. *Int. J. Parasitol.* 2007; 37 (3-4): 329-339.

- Kobayashi Y., Yamada M., Omata Y., Koyama T., Saito A., Matsuda T., Okuyama K., Fujimoto S., Furuoka H., Matsui T. Naturally-occurring *Neospora caninum* infection in an adult sheep and her twin fetuses. *J Parasitol.* 2001; 87(2):434-436.
- Linares G., Santiago B., Rojas F. El ovino raza Junín. SAIS Túpac Amaru Ltda. N° 1 División de producción. 2012; 1:1-7.
- Lindsay D., Rippey N., Powe T., Sartin E., Dubey J., Blagburn B. Abortions, fetal death, and stillbirths in pregnant pygmy goats inoculated with tachyzoites of *Neospora caninum*. *Am J Vet Res.* 1995; 56(9):1176–1180.
- Lindsay D., Steinberg H., Dubielzig R., Semrad S., Konkle D., Miller P., Blagburn B. Central nervous system neosporosis in a foal. *J Vet Diagn Invest.* 1996; 8(4): 507-510.
- Lindsay D., Dubey J., Duncan R. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet parasitol* 1999; 82(4): 327-333.
- Marsh A., Barr B., Packham A., y Conrad P. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J Parasitol.* 1998; 84(5): 983- 991.
- [MINAGRI] Ministerio de agricultura y Riego. Diagnóstico de Crianzas Priorizadas para el Plan Ganadero 2017 – 2021. Lima 2017; 21 p.
- McAllister M., McGuire A., Jolley W., Lindsay D., Trees A., Stobart R. Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet Pathol.* 1996; 33(6): 647–655.
- McAllister M., Dubey J., Lindsay D., Jolley W., Wills R., McGuire A. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998; 28(9): 1473-1478.
- Molina Tuesta M.Y. Estudio socioeconómico de la crianza de ovinos (*ovis aries*) en el distrito de Quilahuani provincia de Candarave – Tacna - 2012. Tesis para optar el título profesional de médico veterinario y zootecnista. 2013. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.
- Moore D., Odeón A., Campero C. Neosporosis bovina: una actualización. *Vet Arg.* 2001; 180(13): 752-775.

- Moore D., Leunda M., Zamorano P., Odeón A., Romera S., Cano A., De Yaniz G., Venturini M., Campero C. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet Parasitol.* 2005; 130(1-2): 29-39.
- Moskwa B., Pastusiak K., Bien J, Cabaj W. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. *Parasitol Res.* 2007; 100(3): 633-636.
- Moreno B., Collantes E., Villa A., Navarro A., Regidor-Cerrillo J., Ortega-Mora L. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.* 2012; 187(1-2):312-318.
- Naguleswaran A., Cannas A., Keller N., Vonlaufen N., Björkman C., Hemphill A. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC3 mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host cells unlike that in *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol.* 2002; 32(6): 695-704.
- Nasir A., Lanyon S., Schares G., Anderson M., Reichel M. Sero-prevalence of *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. *Vet Parasitol.* 2012; 186: 480- 485.
- Nishikawa Y., Tragoolpua K., Inoue N., Makala L., Nagasawa H., Otsuka H., Mikami T. In the absence of endogenous gamma interferon, mice acutely infected with *Neospora caninum* succumb to a lethal immune response characterized by inactivation of peritoneal macrophages. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8 (4): 811-816.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Epididimitis Ovin. Capítulo 2.7.9. En: Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2008. p. 10.
- Ooi H., Huang C., Yang C., Lee S. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of this antibodies in various body fluids of cattle. *Vet Parasitol.* 2000; 90(1-2): 47-55.
- Oviedo T., Goretti R., Vargas M., Patarroyo J. Histopatología de la infección experimental de ovejas sin lana *Ovis aries* por *Neospora caninum*. *Rev. MVZ Córdoba* 2003; 8(1):261-264.

- Ortega L., Fernández A., Gómez M. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. *Acta Parasitológica* 2006; 51(1): 1-14.
- Ortega L. Protozoal Abortion in Farm Ruminants: Guidelines for Diagnosis and Control. CABI. 2007; 323-380.
- Panadero R., Paineira A., López C., Vázquez L., Paz A., Díaz P., Dacal V., Cienfuegos S., Fernández G., Lago N. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). *Res. Vet. Sci.* 2010; 88: 111-115.
- Paré J., Thurmond M., Hietala S. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can J Vet Res.* 1996; 60(2): 133-139.
- Paré J., Thurmond M., Hietala S. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol.* 1997; 83(1): 82- 87.
- Pérez F., Ortega L., Álvarez G., Collantes E., Navarro V., García L., Costas E. Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell - culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. *J Parasitol.* 2005; 91 (3): 507- 510
- Peters M., Lutkefels E., Heckerth A., Schares G. Immunohistochemical and muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 2001; 31(10): 1144-1148.
- Puray N., Chávez A., Casas E., Falcón N., Casas G. Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la Sierra Central del Perú. *Rev. Inv. Vet Perú* 2006; 17(2): 189-194.
- Quinn H., Ellis J., Smith N. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol.* 2002; 18(9): 391-394.
- Reichel M., Ross G., McAllister M. Evaluation of an enzymelinked immunosorbent assay for the serological diagnosis of *Neospora caninum* infection in sheep and determination of the apparent prevalence of infection in New Zealand. *Vet. Parasitol.* 2008; 151: 323-326.

- Renart J., Reiser J., Stark G. 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*. 1979; 76 (7): 3116-3120.
- Risco Castillo V. Identificación y caracterización de antígenos específicos del estadio de bradizoíto de "*Neospora Caninum*". Memoria para optar el grado de doctor. 2008. Universidad Complutense de Madrid.
- Ritter D., Kerlin R., Sibert G., Brake D. Immune factors influencing the course of infection with *Neospora caninum* in the murine host. *J. Parasitol*. 2002; 88 (2): 271-280.
- Rodríguez A. M. Transmisión horizontal y vertical de *Neospora caninum* en tres sistemas de cría bovina. Tesis para optar el título de magíster en sanidad animal. 2015. Universidad Nacional de Mar del Plata.
- Rojo Moreno S. Desarrollo de vacunas frente a la neosporosis bovina utilizando aislados de *Neospora Caninum* inactivados y atenuados. Memoria para optar el grado de Doctor. 2012. Universidad Complutense de Madrid.
- Romanelli P., Freire R., Vidotto O., Marana E., Ogawa L., De Paula V., *et al*. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. *Res. Vet. Sci*. 2007; 82(2):202-207.
- Romero J., Perez E., Dolz G., Frankena K. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev Vet Med*. 2002; 53(4): 263- 273.
- Romero J, Pérez E, Frankena K. Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet. Parasitol*. 2004; 123 (3-4): 149-159.
- Sager H., Fischer I., Furrer K., Strasser M., Waldvogel A., Boerlin P., *et al*. A swiss case-control study to assess *Neospora caninum*: associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol* 2001; 102(1-2): 1-15.

- Santiago B. Producción de ovinos Raza Junín. SAIS Túpac Amaru Ltda. N°1. División de producción. 2011.
- [SAIS] Sociedad agrícola de interés social. Informe anual de producción de la Sais Túpac Amaru, 2012.
- Serrano E., Ferre I., Osoro K., Aduriz G., Mateos A., Martínez A., Atxaerandio R., Hidalgo C., Ortega L. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. *Veterinary Parasitology*. 2006; 135(3-4): 197-203.
- Serrano E., Evaristo R., Quispe M., Hinistroza E. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de Lima y comparación entre ELISA e IFI. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 2018; 29(3): 916-922.
- Silva A., Cosendey R., Zandonadi F., Oliveira F., Lilenbaum W., Martins G., Venturi S., Ferreira A. Frequency of anti-*Neospora caninum* antibodies in ovines destined to clandestine slaughter in Río de Janeiro. *Rev. Cienc. Vida*. 2011; 31: 27-31.
- Silva P., Chávez A., Rivera H., Casas E. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 2002; 13(2): 51-55.
- Schares G., Heydorn A., Cuppers A., Conraths F., Mehlhorn H. *Hammondia heydorni*-like oocysts shed by a naturally infected dog and *Neospora caninum* NC-1 cannot be distinguished. *Parasitol Res*. 2001; 87(10):808–816.
- Schares G., Pantchev N., Barutzki D., Heydorn A., Bauer C., Conraths F. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. *Int J Parasitol*. 2005; 35(14): 1525-1537.
- Schares G., Conraths F.J., Reichel M.P. Bovine neosporosis: Comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. *Int J Parasitol* 1999; 29(10): 1659-1667.
- Söndgen P., Peters M., Bärwald A., Wurm R., Holling F., Conraths F., Schares G. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet. Parasitol*. 2001; 102(4): 279-290.

- Speer C., Dubey J. Ultrastructure of Tachyzoites, Bradyzoites and Tissue Cysts of *Neospora caninum*. J Protozool 1989; 36(5): 458- 463.
- Spencer J., Higginbotham M., Young-White R., Guarino A., Blagburn B. *Neospora caninum*: adoptive transfer of immune lymphocytes precipitates disease in BALB/c mice. Vet. Immunol. Immunopathol. 2005; 106 (3-4): 329-333.
- Spilovská S., Reiterová K., Kováčová D., Bobáková M., Dubinský P. The first finding of *Neospora caninum* and the occurrence of other abortifacient agents in sheep in Slovakia. Vet. Parasitol. 2009; 164: 320-323.
- Staska L., McGuire T., Davies C., Lewin H., Baszler T. *Neospora caninum*-infected cattle develop parasite-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes. Infect. Immun. 2003; 71 (6): 3272-3279.
- Strohbusch, M., Muller, N., Hemphill, A., Krebber, R., Greif, G., Gottstein, B. Toltrazuril treatment of congenitally acquired *Neospora caninum* infection in newborn mice. Parasitol. Res. 2009; 104 (6): 1335-1343.
- Tanaka T., Hamada T., Inoue N., Nagasawa H., Fujisaki K., Suzuki N., Mikami T. The role of CD4+ or CD8+T cells in the protective immune response of BALB/c mice to *Neospora caninum*. Vet. Parasitol 2000; 90: 183-191.
- Tizard I. Inmunología Veterinaria. 6ta ed. 2000. México: Mc Graw-Hill Interamericana. 517 p.
- Thompson G., Canada N., Topa M., Silva E., Vaz F., Rocha A. First confirmed case of *Neospora caninum* associated abortion outbreak in Portugal. Reprod Domest Anim. 2001; 36(6): 309-312.
- Thurmond M., Hietala S. Strategies to Control *Neospora* infection in cattle. The bovine practitioner. 1995; 4(29): 29-32.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76(9): 4350-4354.
- Trees A., McAllister M., Guy C., McGarry J., Smith R., Williams D. *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. Vet. Parasitol. 2002; 109(1-2): 147-154.

- Tress A., Williams D. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Trends Parasitol. 2005; 21(12): 558- 561.
- Tuo W., Fetterer R., Davis W., Jenkins M., Dubey J. *Neospora caninum* anti-gens defined by antigen-dependent bovine CD4+ T cells. J. Parasitol. 2005; 91 (3): 564-568.
- Uggla A., Stenlund S., Holmdahl O., Jakubek E., Thebo P., Kindahl H., Björkman C. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. Int J Parasitol. 1998; 28(9): 1467-1472.
- Vogel F., Arenhart S., Bauermann F. Anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos, ovinos e bubalinos no Estado do Rio Grande do Sul. Cienc. Rural. 2006; 36(6): 1948-1951.
- Williams D., Guy C., McGarry J., Guy F., Tasker L., Smith R., MacEachern K., Cripps P., Kelly D., Tress A. *Neospora caninum* associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. Parasitology. 2000; 121(4): 347-358.
- Williams D., Guy C., Smith R., Guy F., McGarry J., McKay J., Trees A. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. Inter J Parasitol. 2003; 33(10): 1059-1065.
- Williams D., Guy C., Smith R., Ellis J., Bjorkman C., Reichel M., Trees A. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. Infect. Immun. 2007; 75 (3): 1343-1348.
- Williams D., Hartley C., Bjorkman C., Trees A. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. Parasitology. 2009; 136(14): 1895-1900.
- Weston J., Heuer C., Williamson N. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. Prev. Vet. Med. 2012; 103(2-3): 136-144.
- Wouda W., Moen A., Schukken Y. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. Theriogenology. 1998; 49(7): 1311-1316.

Yamane I., Kitani H., Kokuho T., Shibahara T., Haritani M., Hamaoka T., Shimizu S., Koi-wai M., Shimura K., Yokomizo Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. J. Vet. Med. Sci. 2000; 62 (3): 347-351.