

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Fundada en 1551

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros del valle de Lima.

Tesis para optar el Título Profesional de: MÉDICO VETERINARIO

AUTOR:

PABLO SAÚL SILVA SÁNCHEZ

LIMA – PERÚ 2002

Dedicatoria:

A Dios, por ayudarme en cada momento de mi vida.

A mi Madre, por su esfuerzo y sacrificio, de quien tengo el mejor ejemplo de perseverancia, a quien amo y debo lo que soy.

A la Dra. Hermelinda Rivera, por todas las facilidades prestadas para la elaboración de este trabajo y por su confianza y paciencia.

A la Dra. Amanda Chávez, por su dedicación y paciencia durante el desarrollo de la tesis.

A mis familiares y amigos que me dieron su apoyo.

A la memoria de RR, AL, JS y L.

CONTENIDO

	Pág.
TABLA DE CONTENIDO.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
I INTRODUCCIÓN.....	1
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1. Etiología.....	3
2. Epidemiología.....	4
3. Características antigénicas.....	5
4. Ciclo biológico.....	6
5. Características biológicas.....	7
6. Patogenia.....	8
7. Signos clínicos.....	10
8. Impacto económico.....	11
9. Diagnóstico.....	11
9.1 Histología.....	11
9.2 Inmunohistoquímica.....	12
9.3 PCR.....	12
9.4 Pruebas serológicas.....	12
9.4.1 Inmunofluorescencia indirecta.....	12
9.4.2 Aglutinación directa.....	13
9.4.3 ELISA.....	13
*ELISA antígeno crudo.....	13
*ELISA taquizoíto fijado.....	14
*ELISA iscom.....	14
10. Tratamiento.....	14

11. Control.....	15
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
1. Procedencia de las muestras.....	16
2. Muestras.....	16
3. Materiales.....	16
4. Diseño estadístico.....	17
4.1 Tamaño muestral.....	17
4.2 Estratificación de muestras.....	18
5. Determinación de anticuerpos.....	18
6. Análisis de datos.....	19
6.1 Prevalencia.	19
6.2 Prevalencia corregida.....	19
6.3 Intervalo de confianza.....	20
IV RESULTADOS.....	23
V DISCUSIÓN.....	27
VI CONCLUSIONES	30
VII RECOMENDACIONES.....	31
VIII BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	32
IX APÉNDICE.....	39

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Distribución de las muestras según los establos lecheros del valle de Lima, 2000.....	21
Cuadro 2. Distribución de las muestras según los establos lecheros del valle de Lima, zona norte, 2000.....	22
Cuadro 3. Distribución de las muestras según los establos lecheros del valle de Lima, zona sur, 2000.....	22
Cuadro 4. Detección de anticuerpos contra <i>Neospora caninum</i> en establos lecheros del valle de Lima, 2000.....	24
Cuadro 5. Detección de anticuerpos contra <i>Neospora caninum</i> en establos lecheros del valle de Lima, zona norte, 2000.....	25
Cuadro 6. Detección de anticuerpos contra <i>Neospora caninum</i> en establos lecheros del valle de Lima, zona sur, 2000.....	25

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Taquizoítos de <i>Neospora caninum</i> demostrados mediante inmunofluorescencia indirecta.....	26

RESUMEN

Los problemas reproductivos en el ganado bovino lechero, producidos por el parásito *Neospora caninum*, son de gran impacto económico en el ámbito mundial. El objetivo del presente estudio fue determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima en el año 2000. Con este fin se evaluaron 304 sueros de vacas lecheras adultas provenientes de 19 establos lecheros ubicados en la zona norte (n = 12) y en la zona sur (n = 7) del valle de Lima para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). El 29.61% \pm 5.13% (90/304) presentó anticuerpos contra el parásito en una dilución de 1:200. En la zona norte el 40.83% \pm 8.79% (49/120) y en la zona sur 22.28% \pm 6.01% (41/184). Con estos resultados se confirma la presencia del parásito *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima.

Palabras Clave: bovinos, *Neospora caninum*, IFI, seroprevalencia, anticuerpos, lecherías.

SUMMARY

The reproductive problems in dairy cattle produced for *Neospora caninum* have a great economic impact and world-wide distribution. The aim of this study was found the seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy bovines from the valley of Lima in 2000. was evaluated with IFAT 304 serum samples of 19 dairy herds from north (n = 12) and south (n = 7) Lima. 29.61% \pm 5.13% (90/304) presented antibodies against this parasite in 1:200 dilution. 40.83% \pm 8.79% (49/120) in north zone and 22.28% \pm 6.01% (41/184) in the south zone. Which confirm the presence of *Neospora caninum* in dairy bovines in the valley of Lima.

Key words: bovine, *Neospora caninum*, IFAT, seroprevalence, antibodies.

I INTRODUCCIÓN

La ganadería lechera en el país atraviesa en los últimos años una serie de problemas que afectan la economía no sólo de los ganaderos sino también de la nación. De todos los problemas existentes, los que producen mayores pérdidas económicas a nivel mundial son las fallas reproductivas, entre las que destacan los abortos, siendo los agentes infecciosos de diversa etiología los causantes de la gran mayoría de ellas (Anderson *et al*, 1994).

En los últimos años se ha identificado a uno más de los agentes infecciosos causantes de problemas reproductivos en ganado bovino lechero de todo el mundo. Se trata del parásito recientemente identificado como *Neospora caninum*, el cual pertenece a un nuevo género de la familia Sarcocystidae, del phylum Apicomplexa y está estrechamente relacionado al *Toxoplasma gondii* (Holmdahl *et al*, 1994). Los problemas de abortos, principal signo clínico producido por este parásito en el ganado bovino, se pueden presentar en cualquier momento de la gestación, con mayor frecuencia entre el cuarto y sexto mes de gestación (Anderson *et al*, 1994). También, puede provocar la muerte de terneros neonatos o nacimiento de animales enfermos con signos nerviosos, además de animales sin infección aparente, los cuales pueden comportarse como diseminadores de la enfermedad dentro del hato (Schaes *et al*, 1998; Dubey, 1999) la única forma de transmisión reconocida en bovinos es la vertical de madre a cría, vía trasplacentaria, la transmisión horizontal no es muy frecuente en bovinos, pero sí en caninos (Björkman *et al*, 1996; Bergeron *et al*, 2000).

Estudios iniciales indican que los problemas reproductivos, entre los que destacan los abortos, son frecuentes en algunos hatos lecheros del valle de Lima y que *Neospora caninum* tiene una prevalencia de 62% en vacas que abortan (Rivera et al. 2000). El objetivo de este trabajo fue determinar la seroprevalencia del parásito *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima.

II REVISIÓN DE LITERATURA

1. Etiología.

Neospora caninum es un parásito emergente en los últimos años como causa principal de abortos en ganado bovino de todo el mundo. El primer reporte de infección producida por este protozoo de aspecto similar al *Toxoplasma gondii* fue realizado en 1984 en Noruega por observaciones a una camada de perros con diagnóstico de encefalopatía mortal. Posteriormente, en Estados Unidos se aisló un parásito similar en perros con alteraciones neurológicas. Después de varios estudios, se logró identificar y describir a este nuevo parásito con características diferentes a las del *Toxoplasma gondii* (Apéndice 1) y se le denominó *Neospora caninum* (Dubey *et al*, 1988).

La situación taxonómica de este parásito recientemente identificado, ha sido objeto de intenso debate y estudio, algunos autores sostienen que este protozoo vendría a ser considerado como una especie comprendida dentro del género *Toxoplasma* (Mehlhorn y Heydorn, 2000). Pero, actualmente se considera *Neospora* como un nuevo género que está incluido en la familia Sarcocystidae, dentro del phylum Apicomplexa, junto con los géneros *Toxoplasma* y *Sarcocystis*. Siendo *Neospora caninum* la especie representativa de este nuevo género (Holmdahl *et al*, 1994). Recientemente se ha incluido dentro del género *Neospora* a una especie que ha sido encontrada en caballos y presenta diferencias moleculares con *Neospora caninum*. esta nueva especie se denomina *Neospora hughesi* (Marsh *et al*, 1998).

2. Epidemiología.

Neospora caninum fue reconocido como causante de problemas nerviosos en caninos, posteriormente se relaciona por primera vez con un cuadro de aborto bovino en un establo lechero de Nuevo México (Thilsted y Dubey, 1989). Desde entonces se ha comprobado que este protozoo afecta a diferentes especies animales como cabras, ovejas, yeguas, ratones, ciervos (Dubey y Lindsay, 1996), búfalo de agua, coyote, zorro rojo y camellos, de manera experimental a gatos, jerbos (Dubey, 1999), primates no humanos (Barr *et al*, 1994) y cerdos (Jensen *et al*, 1998). Existe controversia en cuanto al potencial zoonótico del parásito (Petersen *et al*, 1999; Tranas *et al*, 1999). Los problemas de abortos asociados a infección por *Neospora caninum* e infecciones congénitas han sido reportados en bovinos de leche y carne (Anderson *et al*, 2000).

Aunque, inicialmente la neosporosis fue descrita en 1988 como una enfermedad neuromuscular grave en el perro, el descubrimiento de *Neospora caninum* como agente causal de aborto en ganado bovino de leche y carne conllevó a la realización de diferentes estudios sobre la enfermedad en esta especie (Dubey, 1999), es así que se ha encontrado que los problemas reproductivos en el ganado bovino lechero producidos por *Neospora caninum* han sido reportados alrededor del mundo y en los Estados Unidos de Norteamérica es la mayor causa de aborto en ganado lechero con prevalencias que van desde 2.17% a 38% (Anderson *et al*, 1994). Canada reportó una prevalencia de 21.9% (Bergeron *et al*, 2000), México presenta actualmente una prevalencia de 56% (Morales *et al*, 2001). En Europa se observó en España una prevalencia de 30.6% al evaluar a 889 vacas lecheras provenientes de 43 hatos del norte del país (Mainar – Jaime *et al*, 1999), Suecia reportó recientemente una prevalencia de 2% (Björkman *et al*, 2000), En el Reino Unido se han reportado prevalencias de 17.1% en Inglaterra (Davison *et al*, 1999a) y 59% en Escocia (Buxton *et al*, 1997), En Dinamarca se encontró el parásito, mediante inmunohistoquímica, en dos fetos abortados de vacas Holstein-Friesian (Agerholm y Barr, 1994), Alemania presentó una prevalencia de 4.1% mediante inmunofluorescencia indirecta, al evaluar 388

vacas provenientes de hatos con problemas reproductivos (Conraths *et al*, 1996), Holanda mostró una prevalencia de 51.5% en un estudio donde se evaluaron 50 hatos lecheros (Wouda *et al*, 1999a), Francia realizó una encuesta serológica mediante una prueba de ELISA en 575 vacas de raza normanda y 219 de raza charoláis que tuvieron problemas de aborto y encontraron una prevalencia de 26% y 14% respectivamente (Klein *et al*, 1997). En Asia se logró aislar el parásito en 9 fetos y 2 terneros nacidos de vacas sospechosas de infección por *Neospora caninum* en Corea del Sur (Kim *et al*, 2000) y Taiwán reportó una prevalencia de 44.9% (Ooi *et al*, 2000). En el Continente Oceánico, se reportó en Australia una prevalencia de 24% (Atkinson *et al*, 2000). En Sudamérica también se reportó la presencia del parásito, así en Argentina, por medio de inmunohistoquímica en dos fetos abortados de vacas se obtuvo presencia del parásito, además se obtuvo una prevalencia de 56.9% en vacas Holando Argentino (Campero *et al*, 1998), En Bahía, Brasil se evaluaron diez sueros de vacas holstein cruzadas encontrándose seis sueros positivos a *Neospora caninum*, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (Gondim *et al*, 1999a) y en Perú se encontraron anticuerpos contra *Neospora caninum* mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta en 18 de 29 sueros de vacas que tuvieron problemas de aborto (Rivera *et al*, 2000).

3. Características antigénicas.

Neospora caninum, es la primera especie identificada del género *Neospora*. Se incluye en el mismo género a una especie que ha sido identificada en equinos y es denominada *Neospora hughesi*, la cual difiere de la primera en estructura molecular, al encontrarse diferencias entre los antígenos de superficie (SAG1) y los antígenos de superficie 1 de secuencias relativas (SAS2), se halló una diferencia de 6% en la secuencia de aminoácidos entre NcSAG1 y NhSAG1 y de 9% entre NcSAS2 y NhSAS2 (Marsh *et al*, 1998). Los primeros aislamientos de *Neospora caninum* se obtuvieron en los Estados Unidos, desde ese entonces se han realizado muchos aislamientos del parásito en bovinos y caninos en otras partes del mundo y se presentan en el Apéndice 2.

Se llevaron a cabo estudios en el ámbito molecular, para caracterizar los aislamientos de *Neospora caninum*, pero no se encontraron diferencias en el análisis de secuencia 16S del rRNA, el espaciador de transcripción interna 1 (ITS1), la microscopía electrónica y en el análisis de proteínas entre los aislamientos Nc – SweB1 de origen bovino y Nc - 1 de origen canino; previamente, no se encontraron diferencias en la secuencia del ITS1 entre el Nc – 1 y Nc – Liv, ambos de origen canino. Todo lo cual sugiere que los aislamientos bovinos serán referidos como *Neospora caninum* hasta que se presenten otras evidencias (Holmdahl *et al*, 1997).

Se han reconocido aproximadamente unas 20 proteínas, cuyos pesos moleculares oscilan entre 16-kDa y 80-kDa como antígenos de *Neospora caninum*, entre las cuales sobresalen cuatro, identificados como mayores antígenos del parásito, y son identificados de acuerdo a su peso molecular como 17-kDa, 29-kDa, 30-kDa y 37-kDa que se localizan en el taquizoíto. Estas, son reconocidas mayormente por los anticuerpos desarrollados por los animales infectados (Dubey y Lindsay, 1996). De manera que, por medio de anticuerpos monoclonales, se ha podido identificar a otras proteínas específicas de *Neospora caninum*, las cuales han sido identificadas de acuerdo a su localización en antígenos de superficie, cuyos pesos moleculares son: 19-kDa, 38-kDa y 40-kDa. Todas presentes en los taquizoítos y bradizoítos, a excepción del 38-kDa que no se aprecia en los bradizoítos, y los antígenos de los gránulos densos y la vacuola parasitófora, cuyo peso molecular es de 33-kDa y está presente en los taquizoítos y bradizoítos (Schaes *et al*, 1999).

4. Ciclo biológico.

Se determinó que el perro es el hospedero definitivo de este parásito y son ellos los que diseminan al medio ambiente los ooquistes no esporulados (McAllister *et al*, 1998). Estos ooquistes se hacen infectivos al esporular en el medio ambiente a las 24 horas. Los ooquistes esporulados al ser ingeridos por algún animal hospedero llegan al tracto intestinal liberando los esporozoítos y

estos penetran en las células entéricas transformándose en taquizoítos (Lindsay *et al*, 1999).

Estos taquizoítos son viables a 4°C por 14 días, pero no resisten temperatura de congelación, penetran en las células hospederas por invasión activa localizándose en el citoplasma, dentro de una vacuola parasitófora, la cual se puede apreciar en número variado dentro de una misma célula hospedera (Dubey y Lindsay, 1996). Estos taquizoítos se dividen rápidamente por endodiogenia y suelen agruparse formando quistes tisulares de forma redondeada a oval. Se pueden apreciar con mayor frecuencia en tejido nervioso, luego pueden transformarse en bradizoítos. Se sugiere que sólo los bradizoítos pueden inducir la excreción de ooquistes en el perro (Lindsay *et al*, 1999), estos bradizoítos son resistentes a la solución de HCl – Pepsina (Dubey y Lindsay, 1996). El ciclo biológico de *Neospora caninum* se resume en el Apéndice 3.

5. Características biológicas.

Los ooquistes de *Neospora caninum* miden de 10 a 11 μm de diámetro y no se pueden diferenciar morfológicamente de los ooquistes de *Hammondia heydorni* y *Hammondia hammondi* (Dubey, 1999). Los ooquistes esporulados contienen 2 esporoquistes, cada uno conteniendo 4 esporozoítos y presentan las paredes más engrosadas en comparación con el *Toxoplasma gondii* (Lindsay *et al*, 1999).

Los taquizoítos tienen forma ovoide y pueden llegar a medir entre 3 - 7 μm por 1 - 5 μm y se caracterizan por presentar 3 capas de plasmalema o cubierta. Una externa y una interna que es doble, 22 microtúbulos subpeliculares, 2 anillos apicales, 1 conoide, 1 anillo polar, mitocondria, más de 150 micronemas, 8 a 18 roptrias las cuales contienen material electrodensito y son de dos a cuatro veces más gruesas que el diámetro de los micronemas, aparato de Golgi, retículo endoplasmático liso y rugoso, 1 núcleo y 1 nucleolo. Estos taquizoítos se dividen rápidamente por endodiogenia y suelen agruparse formando quistes tisulares de forma redondeada a oval cuya pared es lisa y puede llegar a medir más de 4 μm (Dubey, 1999), y más de 107 μm de longitud,

luego pueden transformarse en bradizoítos cuyo tamaño varía entre 6 - 8 *um* por 1 - 1.8 *um* y son morfológicamente similares a los taquizoítos, salvo por la presencia de un número menor de roptrias (Dubey y Lindsay, 1996). En el Apéndice 4 se describe un taquizoíto de *Neospora caninum*.

6. Patogenia.

La información obtenida hasta el momento sobre el mecanismo de acción patógena de *Neospora caninum* es muy limitada, se ha llegado a determinar que el perro es el hospedero definitivo de este parásito (McAllister *et al*, 1998) y la única forma de transmisión reconocida en bovinos es la vertical, de madre a cría vía trasplacentaria (Björkman *et al*, 1996). La forma de transmisión horizontal, por contacto directo, no es muy frecuente en los bovinos pero sí en caninos (Bergeron *et al*, 2000). Aunque se llegó a determinar contagio por ingesta de alimento contaminado con ooquistes provenientes de perros infectados (De Marez *et al*, 1999) y experimentalmente, por ingesta de calostro contaminado con ooquistes (Uggla *et al*, 1998). Una vez dentro del organismo hospedero, los taquizoítos pueden infectar las células de casi todos los tejidos del animal, evidenciándose un mayor tropismo hacia las células del sistema nervioso central, células musculares esqueléticas y cardíacas y células endoteliales (Dubey y Lindsay, 1996). Experimentalmente, se ha observado que los taquizoítos se adhieren a las células y posteriormente las invaden, rodeándose de una parte de la membrana plasmática de la célula hospedera (Dubey, 1999), mediante este proceso el parásito se puede localizar intracitoplasmáticamente en los primeros cinco minutos de contacto con la célula (Dubey y Lindsay, 1996).

La multiplicación activa de los taquizoítos de *Neospora caninum* en las células infectadas ocasiona la destrucción de las mismas y da lugar a la aparición de focos de necrosis, los cuales constituyen la principal lesión de esta enfermedad (Lindsay *et al*, 1999). En el área de multiplicación parasitaria, el hospedero desarrolla una respuesta inflamatoria no purulenta, constituida por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas que rodean a dichas áreas necróticas. En el sistema nervioso central el parásito invade de forma activa

neuronas y astrocitos, provocando trastornos neuromusculares graves por destrucción de células nerviosas lo que afecta la transmisión del impulso nervioso (Dubey y Lindsay, 1996).

El conocimiento de los mecanismos de acción patógena del parásito responsables de la muerte del feto es también escaso. Se sabe que el aborto puede presentarse entre el tercer y noveno mes de gestación, ocurriendo con mayor frecuencia entre el cuarto y sexto mes (Anderson et al, 1994), se sugiere que el aborto se produciría tanto por la invasión placentaria con la respectiva necrosis y placentitis que se desencadena en este órgano, como por las lesiones inducidas en el feto. Sin embargo, en todos los casos no produce la muerte (Dubey y Lindsay, 1996). Infecciones experimentales llevadas a cabo con taquizoítos de *Neospora caninum* estimularon la formación de Linfocitos CD4+, los cuales responden contra los antígenos del parásito *in Vitro*. Además, se observó la producción de interferón gamma, el cual inhibe significativamente la multiplicación de taquizoítos de *Neospora caninum* (Innes et al, 2000).

La forma de transmisión vertical, frecuente en bovinos, podría mantener la infección latente por muchos años en un mismo hato (Schares et al, 1998). Se ha establecido una relación directa entre la infección por *Neospora caninum* en vacas de establos lecheros y la presencia de perros infectados por este parásito (Wouda et al, 1999b). Habiéndose llegado a encontrar el parásito en canales bovinas (Wyss et al, 2000).

Se sugiere que un cuadro de inmunosupresión por ingesta de algunas micotoxinas puede ser un factor que contribuiría a los abortos por *Neospora caninum* (Bartels et al, 1999). Además, se sostiene que los cambios patológicos en la placenta, inducidos por infecciones concomitantes, como la producida por el virus de la Diarrea Viral Bovina, podrían favorecer a otros patógenos a atravesar de manera más simple la barrera materno – fetal (Björkman et al, 2000).

7. Signos clínicos.

En los bovinos adultos el aborto es el único signo clínico observado en hembras gestantes infectadas, los abortos pueden producirse en cualquier época del año y presentarse en forma esporádica, o en forma de brotes endémicos, sin otras señales de enfermedad previa (Dubey y Lindsay, 1996). El aborto puede producirse en vacas de primer parto o multíparas, la fertilidad después del aborto no se ve afectada y las vacas entran en celo sin mayor dificultad. Un pequeño porcentaje de animales puede volver a abortar en la gestación siguiente y en otras posteriores (Stenlund *et al*, 1999). Los abortos suelen presentarse entre el tercer mes hasta el término de la gestación siendo la mayor frecuencia de abortos entre el cuarto y el sexto mes de gestación (Anderson *et al*, 1994). Vacas seropositivas, con anticuerpos contra *Neospora caninum*, son más susceptibles para abortar que vacas seronegativas (Wouda *et al*, 1998). No se ha establecido si la infección por este parásito puede causar problemas reproductivos en estadíos tempranos de gestación, pero se reportó muerte y momificación de fetos de aproximadamente 3 meses de edad gestacional asociado a brotes de neosporosis (Anderson *et al*, 2000).

La infección del feto no siempre provoca la muerte y en ocasiones se produce el nacimiento de terneros infectados congénitamente y con signos nerviosos (Dubey, 1999). Los fetos presentan lesiones en cerebro e hígado, compatibles con encefalitis multifocal con gliosis y hepatitis multifocal, placenta (Schaes *et al*, 1997), corazón, compatible con miocarditis difusa no supurativa (Agerholm y Barr, 1994), riñón, músculo esquelético y glándula adrenal (Anderson *et al*, 1994). El feto abortado se presenta usualmente autolisado, con acumulación de fluido serosanguinolento en las cavidades del cuerpo (Anderson *et al*, 2000).

En caninos, el signo clínico más relevante es la paresia e hiperextensión de los miembros posteriores con atrofia de la musculatura de la zona y rigidez del tarso, esto es observable en los primeros seis meses de vida en cachorros nacidos infectados. Debido a la presentación de una severa polimiositis y una

meningoencefalomielitis diseminada, igualmente se puede presentar miocarditis, neumonía y dermatitis (Peters *et al*, 2000).

8. Impacto económico.

El impacto económico de la infección por *Neospora caninum*, radica en la pérdida de animales de reemplazo debido a los abortos. Está demostrado que las vacas infectadas con *Neospora caninum* tienen mayor riesgo de aborto que las vacas que no presentan la infección (Wouda *et al*, 1998). Además, traen como consecuencia eliminación de animales del hato (Thurmond y Hietala, 1996), disminución de la producción láctea y una vida productiva acortada, basado en un estudio con vacas seropositivas que produjeron 1.25 kilos menos de leche y fueron sacadas tempranamente del hato (Thurmond y Hietala, 1997), mortalidad neonatal elevada, debido al nacimiento de animales con infección trasplacentaria, muerte fetal temprana y reabsorción, retorno de celo, incrementando el tiempo de concepción o infertilidad. Son algunas de las variables observadas, que dependen del grado de infección de cada hato. Además podría apreciarse una reducción del valor de venta del ganado sospechoso de infección (Trees *et al*, 1999).

9. Diagnóstico.

El diagnóstico de la infección por *Neospora caninum* se realiza mediante la utilización de varios ensayos de laboratorio:

9.1. Histología.

El diagnóstico presuntivo de la infección por *Neospora caninum* se puede realizar usualmente sobre la base de la identificación de lesiones histopatológicas, especialmente en el cerebro, caracterizados por la presencia de focos de infiltrados celulares no supurativos con ocasionales focos de necrosis, compatibles con encefalitis multifocal y gliosis (Anderson *et al*, 2000; Schares *et al*, 1997). Otras lesiones histológicas que son frecuentemente encontradas se localizan en el corazón y se aprecian como epicarditis y/o miocarditis no supurativa (Agerholm y Barr, 1994; Anderson *et al*, 2000), miositis focal no supurativa, hepatitis portal

no supurativa acompañada de necrosis hepática focal y neumonía intersticial focal no supurativa (Anderson *et al*, 1994; Schares *et al*, 1997).

9.2. Inmunohistoquímica.

Es un efectivo método para identificar el parásito en quistes o en estadios de taquizoíto en tejidos fetales, obteniéndose mejores resultados en secciones de cerebro fetal aunque también el parásito se encuentra frecuentemente en pulmón, riñón y músculo esquelético (Anderson *et al*, 2000). La Inmunohistoquímica es la prueba de elección para identificar y diferenciar a *Neospora caninum* de otros parásitos protozoos y es utilizada para el diagnóstico definitivo de la infección, tanto en vacas como en otras especies (Barr *et al*, 1991).

9.3. PCR.

Recientemente se ha descrito el PCR para la detección de ácidos nucleicos del parásito en los tejidos fetales, esta técnica se basa en la amplificación de la región ITS1 del ADN ribosomal, la amplificación de fragmentos de la región Nc5 del ADN genómico y en la utilización del gen 14-3-3 de *Neospora caninum*. Esta tecnología es de gran utilidad para el diagnóstico porque permite la amplificación de cantidades tan pequeñas de ADN como las que pueden encontrarse en muestras autolisadas o sometidas a fijación química.

9.4. Pruebas serológicas.

9.4.1. Inmunofluorescencia indirecta.

La Inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue la primera prueba serológica usada para la demostración de anticuerpos contra *Neospora caninum*. La prueba se basa en la fijación de taquizoítos intactos de *Neospora caninum* en láminas portaobjeto las cuales son incubadas con el suero problema diluido y en un segundo paso con anticuerpos marcados con fluoresceína dirigidos contra las inmunoglobulinas del suero bajo investigación. La reacción es evaluada bajo el microscopio de fluorescencia; se considera un

resultado positivo cuando se observa brillo fluorescente en todo el contorno del taquizoíto. Si la fluorescencia se observa sólo en la parte apical o no está presente en todo el contorno se considera como un resultado negativo (Björkman y Uggla, 1999). Esta prueba tiene una sensibilidad de 98% y una especificidad de 99% (Packham *et al*, 1998).

La Inmunofluorescencia indirecta es usada frecuentemente como prueba de referencia para anticuerpos de *Neospora caninum*, con la cual otras pruebas son comparadas. Esta prueba está disponible comercialmente por VMRD, Inc. USA (Björkman y Uggla, 1999),

9.4.2. Aglutinación directa.

El principio de la prueba de aglutinación directa es que los taquizoítos intactos, tratados con formalina, se aglutinan en presencia de anticuerpos específicos presentes en el suero. Existe una prueba modificada que detecta solamente Ig G porque las Ig M específicas y no específicas son destruidas por el mercaptoetanol cuando se incluye en esta prueba modificada (Packham *et al*, 1998). La prueba de aglutinación directa se encuentra recientemente en forma comercial por Vétoquinol (Björkman y Uggla, 1999).

9.4.3. ELISA.

Existen en la actualidad varias pruebas de ELISA para el diagnóstico de *Neospora caninum*. Algunas de ellas son:

*ELISA antígeno crudo.

Se utilizan diferentes preparaciones de antígeno crudo conteniendo una mezcla de antígenos intracelulares y de membrana sometidos a diversos tratamientos, están disponibles en forma comercial como HerdChek Anti-Neospora por IDEXX Laboratories. USA.

*ELISA taquizoíto fijado.

Para esta prueba se utilizan taquizoítos purificados y se fijan con formalina buferada al 4%, para hacer accesibles los antígenos de la superficie de membrana a los anticuerpos presentes en el suero, esta prueba está disponible en forma comercial como Mastazyme-Neospora por MAST Diagnostics en el Reino Unido.

*ELISA iscom.

Algunas modificaciones para mejorar la especificidad de las pruebas de ELISA para el diagnóstico de *Neospora caninum*, incluyen el uso de complejos inmunoestimulantes (iscom), entre los que destacan el uso de anticuerpos monoclonales para inmunoglobulinas específicas o antígenos de superficie de taquizoitos y antígenos específicos de *Neospora* clonados molecularmente (Björkman y Lundén, 1998). Esta prueba posee la ventaja de que el anticuerpo monoclonal de Ig G1 bovino conjugado como anticuerpo secundario es el que tiene reacción cruzada con inmunoglobulinas de otros rumiantes, por lo tanto, el ELISA iscom puede ser usado también para analizar suero de otros rumiantes (Björkman y Uggla, 1999).

10. Tratamiento.

El tratamiento de la neosporosis en caninos ha sido satisfactorio en algunos perros con signos iniciales de la enfermedad, la respuesta del paciente dependerá del estadio en que se encuentre la enfermedad al momento de iniciarse el tratamiento. Se ha establecido que una combinación de trimetoprim y sulfadiazina en una dosis standard de 15 mg/kg, dos veces al día, y pirimetamina a 1 mg/kg por día todo durante cuatro semanas revierte la parálisis asociada a *Neospora caninum* en algunos perros. Trabajos experimentales *in vitro* e *in vivo* con diferentes drogas no han dado resultado en bovinos (Dubey y Lindsay, 1996). Un resumen de los tratamientos ensayados hasta el momento se describen en los Apéndices 5 y 6.

11. Control.

Las medidas recomendadas para el control de *Neospora caninum*, en bovinos lecheros, se basan en la identificación de animales seropositivos y según esos datos se pueden tomar las siguientes medidas:

Si la serología indica alta prevalencia del parásito se podría mantener dentro del hato los animales problema, pero en un sector donde se encuentren debidamente identificados y a las crías de estos animales practicarles serología antes que tomen el calostro. Si los terneros nacen sin infección, deben ser alimentados con calostro de madres seronegativas y pueden ser mantenidos en el hato para ser utilizados como recria.

De otro modo, si la serología de las vacas indica baja prevalencia se podría eliminar a los animales infectados o realizar una separación paulatina del resto de los animales (Thurmond y Hietala, 1995).

Con relación al desarrollo de vacunas para la prevención de la neosporosis, la empresa Bayer elaboró una vacuna, basándose en taquizoítos derivados de cultivos celulares, la cual se viene distribuyendo en los Estados Unidos. Se demostró que la vacuna es segura al aplicarse por vía subcutánea, no presenta reacciones en el sitio de aplicación, y contribuyó en aumentar el título de anticuerpos contra el parásito (Choromanski y Block, 1999).

III MATERIALES Y MÉTODOS

1. Procedencia de las muestras.

El presente estudio se llevó a cabo en bovinos lecheros de crianza intensiva del valle de Lima, agrupándose en dos zonas. La zona norte comprendida entre los kilómetros 0 y 150 de la carretera Panamericana norte, hasta la provincia de Huacho y la zona sur, comprendida entre los kilómetros 0 y 150 de la carretera Panamericana sur, hasta la provincia de Cañete, con una extensión de 300 Km entre ambos puntos. El área de muestreo se encuentra entre los 0 a 500 m.s.n.m., presenta un clima templado con temperaturas máximas de 28°C y mínimas de 12°C, con una humedad relativa cercana al 95%.

2. Muestras.

Las muestras evaluadas pertenecieron al banco de sueros del laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, obtenidas durante el año 2000, para el estudio las muestras fueron seleccionadas al azar de 19 establos con una población total de 4410 vacas.

3. Materiales.

Los materiales utilizados para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en las muestras remitidas fueron:

- Tips descartables para pipetas.
- Micropipetas "BIOHIT" de 5:50 ul y 50:200 ul.

- Centrífuga “Selecta” de 5,000 rpm.
- Balanza analítica “OHAUS”.
- Agitador “Stuart Scientific”.
- Estufa “Gallenkamp” de 37 °C.
- Microscopio de fluorescencia “Leica”
- Antígeno de *Neospora caninum* (Taquizoíto fijado) de procedencia comercial (VMRD, USA).
- Anti Ig G1 bovino marcado con isotiocianato de fluoresceína (VMRD, USA).
- Suero bovino hiperinmune anti *Neospora caninum* - control positivo (VMRD, USA).
- Suero bovino negativo a anticuerpos contra *Neospora caninum* (VMRD, USA).
- Solución salina buferada (PBS).

4. Diseño estadístico.

4.1 Tamaño muestral:

El tamaño muestral se calculó mediante la fórmula para estimar una proporción (Miguel, 1982), utilizando una prevalencia referencial de 27% (Rivera, H. Comunicación personal), con un nivel de confianza de 95%.

En fórmula:

$$n \approx Z^2 \frac{(pq)}{E^2}$$

Donde:

$Z = 1.96$ (95% de nivel de confianza).

$p = 0.27$ (Prevalencia referencial).

$q = 0.73$ (Complemento de la prevalencia referencial).

$E = 0.05$ (Error máximo permisible).

El tamaño de la muestra ($n = 304$) representa el número mínimo de animales a muestrearse.

4.2 Estratificación de muestras.

Para mejorar la cobertura del muestreo en el valle de Lima, las muestras fueron estratificadas por establos utilizando la siguiente fórmula (Daniel, 1996):

$$nh \approx \frac{Nh}{N} \times n$$

Donde:

nh = n° de muestras del establo h.

Nh = n° Animales del establo h.

N = Población total.

n = Tamaño muestral.

El muestreo dentro de los establos se llevó a cabo mediante el sistema aleatorio, los resultados de la estratificación de muestras se presentan en el cuadro 1 y por zonas en los cuadros 2 y 3.

5. Determinación de anticuerpos.

Los anticuerpos contra *Neospora caninum* fueron determinados mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), adquirida en forma de kit comercial (VMRD, USA), de acuerdo al manual proporcionado por dicha compañía y consistió en:

- * Antes de iniciar la prueba, los reactivos debieron estar a temperatura ambiental.
- *Se diluyó la muestra de suero en proporción 1:200 en solución salina buferada.
- *Se utilizaron láminas en las cuales los taquizoítos estuvieron fijados en 12 pocillos cada uno. En los 2 primeros pocillos de la lámina que contiene el antígeno se colocaron los antiseros de referencia positivo y negativo.
- *Se transfirieron 20 ul de suero diluido de cada animal hasta completar la lámina (10 muestras por lámina) se incubó la lámina por 30 minutos a 37°C

en cámara húmeda, después del cual se procedió a lavar la lámina con solución salina buferada.

*Inmediatamente se aplicaron a todos los pocillos de la lámina 20 ul del conjugado (Anti Ig G1 bovino). Incubándose la lámina por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, al cabo del cual se lavó nuevamente con solución salina buferada.

*Finalmente, se dejó secar la lámina a temperatura ambiente y se montó con glicerina al 50% pH 8. Observándose inmediatamente en microscopio de fluorescencia para la lectura correspondiente.

Interpretación:

*Positivo, si se observa fluorescencia en todo el contorno del taquizoíto.

*Negativo, si no hay fluorescencia o esta es parcial.

6. Análisis de datos.

6.1. Prevalencia (Pa).

La prevalencia de *Neospora caninum*, en bovinos lecheros del valle de Lima, se estimó mediante la fórmula (Thrusfield, 1990):

$$Pa \approx \frac{n^{\circ} \text{muestras positivas}}{n^{\circ} \text{total muestras}} 100$$

6.2. Prevalencia corregida (Pr).

Se obtuvo sobre la base de los datos de 98% de sensibilidad y 99% de especificidad de la prueba utilizada (Packham *et al*, 1998), mediante la siguiente fórmula (Thrusfield, 1990):

$$Pr \approx \frac{P + E - 1}{S + E - 1}$$

Donde:

Pr= Prevalencia corregida.

P= Prevalencia encontrada.

S= Sensibilidad.

E= Especificidad

6.3. Intervalo de confianza (IC).

Se estimó mediante la siguiente fórmula (Armitage y Berry, 1987):

$$IC \approx P \pm Z \sqrt{\frac{pq}{n}}$$

Donde:

p = Prevalencia

$q = 1 - P$

Z = 95% de nivel de confianza.

n = Tamaño muestral.

Cuadro 1. Distribución de las muestras según los establos lecheros del valle de Lima, 2000.

NÚMERO DE ESTABLO	POBLACIÓN DE VACAS EN PRODUCCIÓN	MUESTRAS ESTRATIFICADAS
1	200	14
2	650	45
3	250	17
4	680	47
5	200	14
6	120	8
7	370	25
8	100	7
9	250	17
10	70	5
11	50	3
12	80	6
13	160	11
14	80	6
15	280	19
16	300	21
17	100	7
18	440	30
19	30	2
TOTAL	4410	304

Cuadro 2. Distribución de las muestras según los establos lecheros del valle de Lima, zona norte, 2000.

NÚMERO DE ESTABLO	POBLACIÓN DE VACAS EN PRODUCCIÓN	MUESTRAS ESTRATIFICADAS
1	200	14
3	250	17
7	370	25
8	100	7
9	250	17
10	70	5
11	50	3
12	80	6
13	160	11
14	80	6
17	100	7
19	30	2
TOTAL	1740	120

Cuadro 3. Distribución de las muestras según los establos lecheros del valle de Lima, zona sur, 2000.

NÚMERO DE ESTABLO	POBLACIÓN DE VACAS EN PRODUCCIÓN	MUESTRAS ESTRATIFICADAS
2	650	45
4	680	47
5	200	14
6	120	8
15	280	19
16	300	21
18	440	30
TOTAL	2670	184

IV RESULTADOS

El 29.61% \pm 5.13% (90/304) de las muestras evaluadas presentaron anticuerpos contra *Neospora caninum* (Cuadro 4). La prevalencia corregida fue de 30.52% \pm 5.18%. El 100% de los establos evaluados presentaron animales con presencia de anticuerpos contra el parásito.

La seroprevalencia de *Neospora caninum* en los animales de los establos ubicados en la zona norte fue de 40.83% \pm 8.79% (49/120) variando entre 14.29% y 64.71% (Cuadro 5) con una prevalencia corregida de 42.08% \pm 8.83%, mientras que en los animales de los establos ubicados en la zona sur fue de 22.28% \pm 6.01% (41/184) variando entre 3.33% y 50% (Cuadro 6) con una prevalencia corregida de 22.96% \pm 6.08%.

Cuadro 4. Detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en establos lecheros del valle de Lima, 2000.

NÚMERO DE ESTABLOS	MUESTRAS TRABAJADAS	ANIMALES SEROPOSITIVOS	% ± IC
1	14	4	28.57
2	45	14	31.11±13.5
3	17	9	52.94
4	47	10	21.28±11.7
5	14	5	35.71
6	8	4	50.00
7	25	10	40.00
8	7	4	57.14
9	17	11	64.71
10	5	1	20.00
11	3	1	33.33
12	6	2	33.33
13	11	2	18.18
14	6	2	33.33
15	19	5	26.32
16	21	2	9.52
17	7	1	14.29
18	30	1	3.33±6.4
19	2	1	50.00
TOTAL	304	90	29.61± 5.1

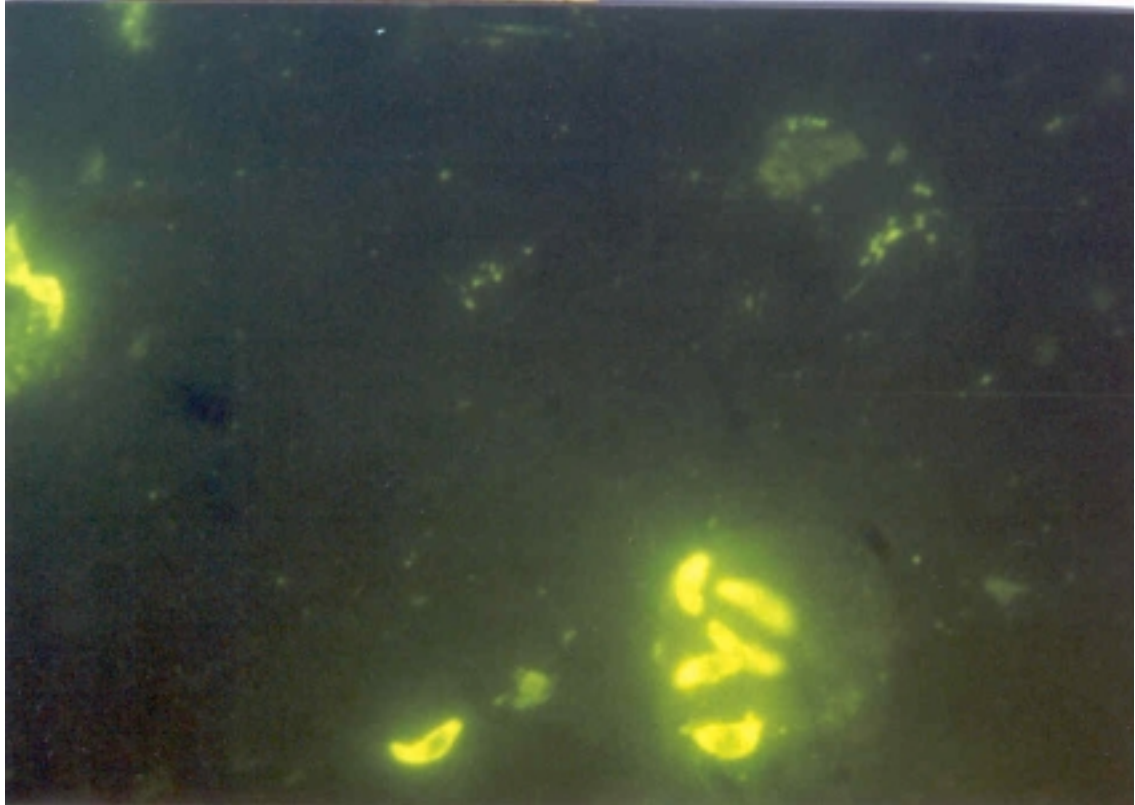
Cuadro 5. Detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en establos lecheros del valle de Lima, zona norte, 2000.

NÚMERO DE ESTABLO	MUESTRAS TRABAJADAS	ANIMALES SEROPOSITIVOS	% ± IC
1	14	4	28.57
3	17	9	52.94
7	25	10	40.00
8	7	4	57.14
9	17	11	64.71
10	5	1	20.00
11	3	1	33.33
12	6	2	33.33
13	11	2	18.18
14	6	2	33.33
17	7	1	14.29
19	2	1	50.00
TOTAL	120	49	40.83 ± 8.8

Cuadro 6. Detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en establos lecheros del valle de Lima, zona sur, 2000.

NÚMERO DE ESTABLO	MUESTRAS TRABAJADAS	ANIMALES SEROPOSITIVOS	% ± IC
2	45	14	31.11±13.5
4	47	10	21.28±11.7
5	14	5	35.71
6	8	4	50.00
15	19	5	26.32
16	21	2	9.52
18	30	1	3.33±6.4
TOTAL	184	41	22.28 ± 6

Figura 1. Taquizoítos de *Neospora caninum* demostrados mediante inmunofluorescencia indirecta



V DISCUSIÓN

El parásito *Neospora caninum* ha sido reportado como agente causal de abortos en el ganado bovino de leche y carne en diversas partes del mundo, y al no existir un estudio sobre la seroprevalencia de *Neospora caninum* en ganado bovino lechero de la cuenca de Lima, se realizó este estudio en 304 sueros bovinos provenientes de 19 establos lecheros del valle de Lima, que constituye una de las principales cuencas lecheras de nuestro país, obteniéndose 90 muestras positivas a *Neospora caninum*, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta, alcanzando una prevalencia de $29.61\% \pm 5.13\%$ y una prevalencia corregida de $30.52\% \pm 5.18\%$, La zona norte presentó una prevalencia de $40.83\% \pm 8.79\%$ con una prevalencia corregida de $42.08\% \pm 8.83\%$, mientras que la zona sur mostró una prevalencia de $22.28\% \pm 6.01\%$, con una prevalencia corregida de $22.96\% \pm 6.08\%$.

La zona norte de Lima presentó, en estudios previos, una tasa de abortos cercana al 35%, debido principalmente al virus BVD (Rivera, H. Comunicación personal), este precedente podría haber influido en la alta prevalencia de la zona, tomando como referencia un estudio previo donde se asoció la presencia de *Neospora caninum* e infección concomitante con virus BVD (Björkman et al, 2000), ya que otros factores de riesgo como presencia de perros en los establos, raza, edad y tipo de explotación estuvieron presentes en iguales condiciones en todos los establos evaluados del valle de Lima.

Además, animales procedentes de lugares con alta prevalencia a *Neospora caninum* podrían haber llegado a la zona norte del valle de Lima y provocar un aumento del número de animales seropositivos, ya que la probabilidad de que vacas seropositivas tengan descendencia con las mismas características es muy elevada, en ese sentido, en el Reino Unido se evaluaron 372 vacas con sus respectivos terneros, previo a la ingesta de calostro, con una prueba de ELISA. Dicha prueba demostró que 124 vacas eran seropositivas a *Neospora caninum* y de las cuales 118 produjeron terneros seropositivos, dando una probabilidad de transmisión vertical de 95.2%. Estos resultados revelan que vacas seropositivas tienen mayor probabilidad de producir terneros infectados (Davison *et al*, 1999b). Lo cual conlleva a perpetuar la infección en el hato.

Los resultados obtenidos en el estudio confirman la presencia de *Neospora caninum* en el valle de Lima, en ese sentido, estudios preliminares detectaron la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en Cajamarca, encontrando una prevalencia de 42.9% (Cabrera *et al*, 2000), y en Arequipa, con una prevalencia de 57% (Andresen, H. Comunicación personal). Por otro lado, un estudio preliminar detectó la presencia de quistes de *Neospora caninum* en 16 de 29 fetos abortados, lo cual confirmaría que la neosporosis se encuentra presente en el país y es causa de abortos en vacas lecheras del valle de Lima (Rivera *et al*, 2000).

En otros países de sudamérica también se confirmó la presencia del parásito, reportándose prevalencias de 14.09% en Brasil, al evaluarse 447 sueros provenientes de vacas lecheras de la ciudad de Bahia (Gondim *et al*, 1999 B) y de 56.9% en Argentina (Campero *et al*, 1998) en ambos casos utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Otros estudios utilizando la misma prueba encontraron una prevalencia de 59% en vacas que tuvieron problemas de aborto en Escocia (Buxton *et al*, 1997), En Taiwán se reportó una prevalencia de 44.9% (Ooi *et al*, 2000) y en un estudio serológico en un establo lechero de Australia, después de una racha de abortos, se encontró una prevalencia de 24% (Atkinson *et al*, 2000). Estos resultados demuestran

que el parásito *Neospora caninum* se encuentra distribuido alrededor del mundo.

En España se encontró una seroprevalencia significativamente alta en ganado lechero de 35.9% comparado con los resultados en ganado de carne que fueron de 17.9% (Quintanilla – Gozalo *et al*, 1999), esto indicaría que en el ganado lechero, debido probablemente al tipo de propósito y tiempo de vida, la prevalencia es mayor.

Las medidas que se recomiendan para el control y prevención de la infección por *Neospora caninum* son, concretamente, la identificación de animales infectados, por medio de pruebas serológicas, para su posterior separación del hato. Además, prohibir el tránsito de perros cerca de los almacenes de alimento para el ganado (Thurmond y Hietala, 1995).

Todos los establos evaluados presentaron animales con títulos de anticuerpos contra *Neospora caninum*, lo que sugiere que la gran mayoría de establos lecheros en el valle de Lima presentan una fuente de infección aún no determinada. Sin embargo, la presencia de anticuerpos contra el parásito en un animal no indica que *Neospora caninum* representa la causa de los problemas reproductivos, aunque, vacas seropositivas, con anticuerpos contra el parásito, tienen mayor probabilidad de tener problemas de aborto o nacimientos de terneros infectados congénitamente (Wouda *et al*, 1998).

Actualmente se vienen desarrollando trabajos de investigación en poblaciones caninas de establos lecheros en el valle de Lima con el fin de determinar si los perros representan un factor de riesgo en la propagación del parásito.

VI CONCLUSIONES

1. En los bovinos lecheros del valle de Lima el parásito *Neospora caninum* presenta una seroprevalencia de 29.61% \pm 5.13%.
2. La totalidad de establos evaluados presentaron al menos un animal seropositivo, lo cual estaría indicando que los animales se encuentran expuestos a una fuente de infección no determinada.

VII RECOMENDACIONES

1. Evaluar los factores de riesgo que pueden influir en la mayor seroprevalencia de *Neospora caninum* hallada en los establos de la zona norte de Lima.
2. Realizar mayor número de estudios de seroprevalencia del parásito en otras zonas ganaderas y así contribuir con la confección del mapa parasitológico de las principales enfermedades parasitarias en medicina veterinaria del país.

VIII BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Agerholm, J. S. y B. C. Barr. 1994. Bovine Abortions Associated with *Neospora* in Denmark. *Acta vet Scand.* 35: 461 – 464.
2. Anderson, M. L.; B. C. Barr y P. A. Conrad. 1994. Protozoal Causes of Reproductive Failure in Domestic Ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 10 (3): 439 – 461.
3. Anderson, M. L.; A. G. Andrianarivo y P. A. Conrad. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim Rep Sci.* 60 – 61: 417 – 431.
4. Armitage, P. y G. Berry. 1987. *Statistical Methods in Medical Research.* 2nd ed. Great Britain. Blackwell Scientific Publications. pp: 115 – 120.
5. Atkinson, R. A.; R. W. Cook, L. A. Reddacliff, J. Rothwell, K. W. Broady, P. A. W. Harper y J. T. Ellis. 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in dairy cattle herd. *Aust Vet J.* 78 (2): 262 – 266.
6. Barr, B. C.; M. L. Anderson, J. P. Dubey y P. A. Conrad. 1991. *Neospora*-Like Protozoal Infections Associated with Bovine Abortions. *Vet Pathol.* 28: 110 – 116.
7. Barr, B. C.; P. A. Conrad, K. W. Sverlow, A. F. Tarantal y A. G. Hendrickx. 1994. Experimental Fetal and Transplacental *Neospora* Infection in the Nonhuman Primate. *Lab Invest.* 71 (2): 236 – 242.
8. Bartels, C. J. M.; W. Wouda y Y. H. Schukken. 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology.* 52: 247 – 257.

9. Bergeron, N.; G. Fecteau, J. Paré, R. Martineau y A. Villeneuve. 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. *Can Vet J.* 41: 464 – 467.
10. Björkman, C.; O. Johansson, S. Stenlund, O. Joakim y A. Uggla. 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 208 (9): 1441 – 1444.
11. Björkman, C. y A. Lundén. 1998. Application of iscom antigen preparations in ELISAs for diagnosis of *Neospora* and *Toxoplasma* infections. *Int J Parasitol.* 28: 187 – 193.
12. Björkman, C. y A. Uggla. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol.* 29: 1497 – 1507.
13. Björkman, C.; S. Alenius, U. Emanuelsson y A. Uggla. 2000. *Neospora caninum* and Bovine Virus Diarrhoea Virus Infections in Swedish Dairy Cows in Relation to Abortion. *Vet J.* 159: 201 – 206.
14. Buxton, D.; G. L. Caldow, S. W. Maley, J. Marks y E. A. Innes. 1997. Neosporosis and bovine abortion in Scotland. *Vet Rec.* 141: 649 – 651.
15. Cabrera, M.; P. Ortiz, J. Claxton, D. Williams y A. Trees. 2000. Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en ganado vacuno en Perú. *Res. IV Congreso Peruano de Parasitología.* p: 212.
16. Campero, C. M.; M. L. Anderson, G. Conosciuto, H. Odriozola, G. Bretschneider y M. A. Poso. 1998. *Neospora caninum*-associated Abortions in a Dairy Herd in Argentina. *Vet Rec.* 143 (8): 228 – 229.
17. Choromanski, L. y W. Block. 1999. Humoral immune responses and safety of experimental formulations of inactivated *Neospora* vaccines. En: *Diseases related to Protozoa and Possibilities for Treatment. Proc 17th Int Conf WAAVP, Bayer Workshop.* Pags: 23 – 25.
18. Conraths, F. J.; C. Bauer y W. Becker. 1996. Nachweis von Antikörpern gegen *Neospora caninum* bei Kühen in hessischen Betrieben mit Abort- und Fruchtbarkeitsproblemen. *Dtsch Tierärztl Wschr.* 103: 221 – 224.
19. Daniel, W. M. 1996. *Bioestadística: Base Para el Análisis de las Ciencias de la Salud.* 5ª Ed. Mexico, Editorial Limusa S. A. pp: 202 – 208.

20. Davison, H. C.; N. P. French y A. J. Trees. 1999a. Herd – specific and age – specific seroprevalence of *Neospora caninum* in 14 british dairy herds. Vet Rec. 144: 547 – 550.
21. Davison, H. C.; A Otter y A. J. Trees. 1999b. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. Int J Parasitol. 29: 1683 – 1689.
22. De Marez, T.; S. Liddell, J. P. Dubey, M. C. Jenkins y L. Gasbarre. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. Int J Parasitol. 29: 1647 – 1657.
23. Dubey, J. P.; J. L. Carpenter, C. A. Speer, M. J. Topper y A. Uggla. 1988. Newly Recognized Fatal Protozoan Disease of Dogs. J Am Vet Med Assoc. 192: 1269 – 1285.
24. Dubey, J. P. y D. S. Lindsay. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol. 67: 1 – 59.
25. Dubey, J. P. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol. 84: 349 – 367.
26. Gondim, L. F. P.; I. F. Sartor, L. A. Monteiro Jr y M. Haritani. 1999a. *Neospora caninum* infection in an aborted bovine foetus in Brazil. N Z Vet J. 47: 35.
27. Gondim, L. F. P.; I. F. Sartor, M. Hasegawa y I. Yamane. 1999b. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. Vet Parasitol. 86: 71 – 75.
28. Gottstein, B.; B. Hentrich, R. Wyss, B. Thür, A. Busato, K. D. C. Stärk y N. Müller. 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. Int J Parasitol. 28: 679 – 691.
29. Holmdahl, O. J.; J. G. Mattsson, A. Uggla y K. E. Johansson. 1994. The Phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Based on Ribosomal RNA Sequences. FEMS Microbiol Lett. 119: 187 – 192.
30. Holmdahl, J.; C. Björkman, S. Stenlund, A. Uggla y J. P. Dubey. 1997. Bovine *Neospora* and *Neospora caninum*: one and the same. Parasitol Today. 13: 40.

31. Innes, E. A.; D. Buxton, S. Maley, S. Wright, J. Marks, I. Esteban, A. Rae, A. Schock y J. Wastling. 2000. Neosporosis: Aspects of Epidemiology and Host Immune Response. *Ann N Y Acad Sci.* 916: 93 – 101.
32. Jensen, L.; T. K. Jensen, P. Lind, S. A. Henriksen, A. Uggla y V. Bille-Hansen. 1998. Experimental porcine neosporosis. *APMIS* 106: 475 – 482.
33. Kim, J. H.; H. J. Sohn, W. S. Hwang, E. K. Hwang, Y. H. Jean, I. Yamane y D. Y. Kim. 2000. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Vet Parasitol.* 90 (1-2): 147 – 154.
34. Klein, F.; S. K. Hietala, H. Berthet, P. Very y D. Gradinaru. 1997. *Neospora caninum*: enquête sérologique sur les avortements des bovins normands et charolais. *Le Point Vét.* 28 (183): 1283 – 1286.
35. Lindsay, D. S.; J. P. Dubey y M. McAllister. 1999. *Neospora caninum* and the Potential for Parasite Transmission. *Comp Cont Ed Pract Vet.* 21 (4): 317 – 321.
36. Mainar – Jaime, R. C.; M. C. Thurmond, B. Berzal – Herranz y S. K. Hietala. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet Rec.* 145: 72 – 75.
37. Marsh, A. E.; B. C. Barr, A. E. Packham y P. A. Conrad. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *J Parasitol.* 84 (5): 983 – 991.
38. McAllister, M. M.; J. P. Dubey, D. S. Lindsay, W. R. Jolley, R. A. Wills y A. M. McGuire. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 28 (9): 1473 – 1478.
39. Mehlhorn, H. y A. O. Heydorn. 2000. *Neospora caninum*: Is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. *Parasitol Res.* 86: 169 – 178.
40. Miguel, O. 1982. Técnicas de amostragem para exames laboratoriais. *Hyg. Alim.* 1(2): 84 – 86.
41. Morales, E.; F. J. Trigo, F. Ibarra, E. Puente y M. Santacruz. 2001. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *J Vet Diagn Invest.* 13 (5): 413 – 415.

42. Ooi, H. K.; C. C. Huang, C. H. Yang y S. H. Lee. 2000. Serological survey and first finding of *Neospora caninum* in Taiwan, and the detection of this antibodies in various body fluids of cattle. *Vet Parasitol.* 90 (1-2): 47 – 55.
43. Packham, A. E.; K. W. Sverlow, P. A. Conrad, E. F. Loomis, J. D. Rowe, M. L. Anderson, A. E. Marsh, C. Cray y B. C. Barr. 1998. A Modified Agglutination Test for *Neospora caninum*: Development, Optimization, and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5 (4): 467 – 473.
44. Peters, M.; F. Wagner y G. Schares. 2000. Canine neosporosis: clinical and pathological findings and first isolation of *Neospora caninum* in Germany. *Parasitol Res.* 86: 1 – 7.
45. Petersen, E.; M. Lebech, L. Jensen, P. Lind, M. Rask, P. Bagger, C. Björkman y A. Uggla. 1999. *Neospora caninum* Infections and Repeated Abortions in Humans. *Emerg Infect Dis.* 5(2): 278 – 280.
46. Rivera, H.; D. Nelson y L. Tabacchi. 2000. *Neospora caninum* y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del valle de Lima. *Rev Inv Vet Perú.* 11 (1): 1 – 7.
47. Schares, G.; M. Peters, R. Wurm, K. Tackmann, K. Henning y F. J. Conraths. 1997. *Neospora caninum* verursacht Aborte in einem Rinderbestand in Nordrhein-Westfalen. *Dtsch tierärztl Wschr.* 104: 208 – 212.
48. Schares, G.; M. Peters, R. Wurm, A. Bärwald y F. J. Conraths. 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol.* 80: 87 – 98.
49. Schares, G.; J. F. Dubremetz, J. P. Dubey, A. Bärwald, A. Loyens y F. J. Conraths. 1999. *Neospora caninum*: Identification of 19-, 38-, and 40-kDa Surface Antigens and a 33-kDa Dense Granule Antigen Using Monoclonal Antibodies. *Exp Parasitol.* 92: 109 – 119.
50. Stenlund, S.; H. Kindahl, U. Magnusson, A. Uggla y C. Björkman. 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 85: 227 – 234.

51. Thilsted, J. P. y J. P. Dubey. 1989. Neosporosis-Like Abortions in a Herd of Dairy Cattle. *J Vet Diagn Invest.* 1: 205 - 209.
52. Thrusfield, M. 1990. *Epidemiología Veterinaria*. Editorial Acribia. pp. 228 – 230.
53. Thurmond, M. y S. Hietala. 1995. Strategies to Control *Neospora* Infection in Cattle. *Bov Pract.* 29: 60 - 63.
54. Thurmond, M. C. y S. K. Hietala. 1996. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am J Vet Res.* 57 (11): 1559 – 1562.
55. Thurmond, M. C. y S. K. Hietala. 1997. Effect of *Neospora caninum* Infection on Milk Production in First-Lactation Dairy Cows. *J Am Vet Med Assoc.* 210: 672 - 674.
56. Tranas, J.; R. A. Heinzen, L. M. Weiss y M. M. McAllister. 1999. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 6(5): 765 – 767.
57. Trees, A. J.; H. C. Davison, E. A. Innes y J. M. Wastling. 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 29 : 1195 – 1200.
58. Ugglå, A.; S. Stenlund, O. J. M. Holmdahl, E. –B. Jakubek, P. Thebo, H. Kindahl y C. Björkman. 1998. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int J Parasitol.* 28: 1467 – 1472.
59. Wouda, W.; A. R. Moen y Y. H. Schukken. 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology.* 49: 1311 – 1316.
60. Wouda, W.; C. J. M. Bartels y A. R. Moen. 1999a. Characteristics of *Neospora caninum* – Associated Abortion Storms in Dairy Herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology.* 52: 233 – 245.
61. Wouda, W.; Th. Dijkstra, A. M. H. Kramer, C. van Maanen y J. M. A. Brinkhof. 1999b. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 29: 1677 – 1682.
62. Wyss, R.; H. Sager, N. Muller, F. Inderbitzin, M. König, L. Audigé y B. Gottstein. 2000. Untersuchungen zum Vorkommen von *Toxoplasma gondii*

und *Neospora caninum* unter fleischhygienischen Aspekten. Schweiz Arch
Tierheilkd. 142 (3): 95 – 108.

IX APÉNDICE

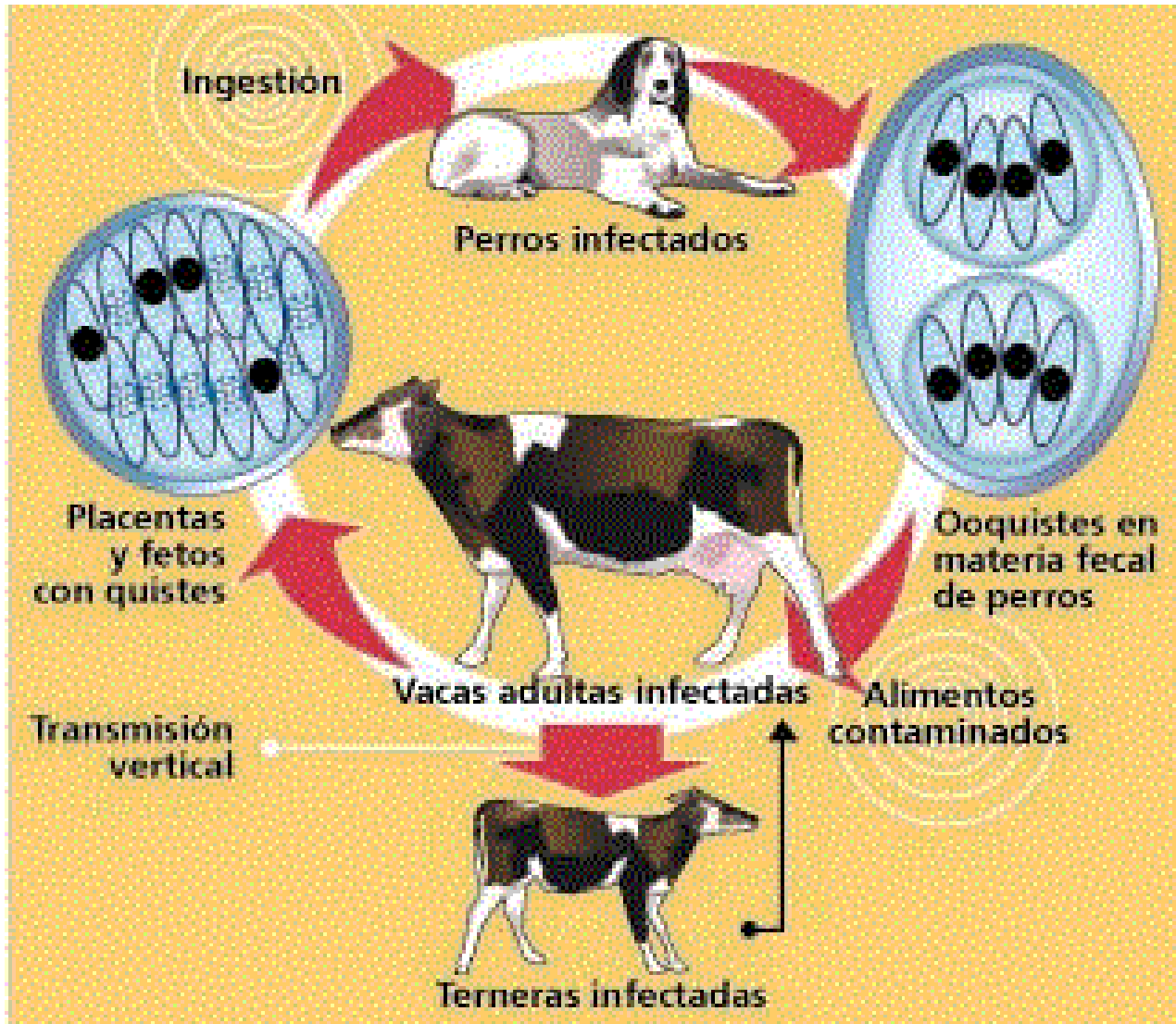
Apéndice 1. Diferencias morfológicas y estructurales entre *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*.

	<i>Neospora caninum</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Quiste con Bradizoíto	Sistema Nervioso Central	SNC y otros órganos
Pared del Quiste	Gruesa: 1 – 4 um	Delgada: 0.5 um
Número de Roptrias	8 – 12	4 – 8
Micronemas anteriores	Numerosos	Escasos
Micronemas posteriores	Escasos	Numerosos
Cuerpos electrodensos	Numerosos	Escasos
Microporos	Escasos	Numerosos

Apéndice 2. Aislamientos de *Neospora caninum*.

Aislamiento	Origen	Procedencia	Año
Nc – 1	Canino	USA	1988
Nc – 2	Canino	USA	1988
Nc – 3	Canino	USA	1988
Nc – Liv	Canino	Reino Unido	1993
Nc – Ger1	Canino	Alemania	1999
Nc – SweB1	Bovino	Suecia	1995
Nc – KB1	Bovino	Corea del sur	2000
Nc – KB2	Bovino	Corea del sur	2000
Nc – PV1	Bovino	Italia	2000
BPa – 1	Bovino	USA	1991
BPa – 2	Bovino	USA	1991
BPa – 3	Bovino	USA	1992
BPa – 4	Bovino	USA	1992
Jpa – 1	Bovino	Japón	1996

Apéndice 3. Ciclo biológico de *Neospora caninum*.



Apéndice 4. Taquizoíto de *Neospora caninum*. Tomado de: Mehlhorn, H. y A. O. Heydorn. 2000. *Neospora caninum*: Is it really different from *Hammondia heydorni* or is it a strain of *Toxoplasma gondii*? An opinion. Parasitol Res. 86: 172.



Leyenda:

AP: Apicoplasto.
ER: Retículo Endoplasmático.
GO: Aparato de Golgi.
MI: Mitocondria.
MN: Micronema.
N: Núcleo.
UN: Nucleolo.
PE: Plasmalema.
V: Vacuola.

Apéndice 5. Fármacos ensayados en cultivo celular contra estadios de *Neospora caninum*.

FRMACO	DOSIS ug/ml	ESTADIO	EFICACIA
SULFONAMIDAS			Coccidiostato 36%
Sulfatiazol	100	Taquizoíto	Sí
Sulfametoxazol	100	Taquizoíto	Sí
Sulfadiazina	100	Taquizoíto y Bradizoíto	Sí
Sulfaquinoxalina	100	Taquizoíto	Sí
Sulfametacina	100	Taquizoíto	Sí
Sulfadimetoxina	10 - 100	Taquizoíto	Sí
Sulfameracina	10 - 100	Taquizoíto	Sí
INHIBIDORES DE DHRF/TS			Coccidicida 100%
Pirimetamina	0.01	Taquizoíto	Sí
Piritrexim	0.001 - 0.01	Taquizoíto	No Eficaz
Ormetoprim	10	Taquizoíto	No Eficaz
Trimetoprim	10	Taquizoíto	No Eficaz
Diaveridina	10	Taquizoíto	No Eficaz
Metotrexato	10	Taquizoíto	No Eficaz
IONOFOROS			
Monensina	0.000001	Taquizoíto	No Eficaz
Lasalocid	0.000001	Taquizoíto	No Eficaz
Maduramicina	0.000001	Taquizoíto	No Eficaz
Narasina	0.000001	Taquizoíto	No Eficaz
Salinomicina	0.000001	Taquizoíto	No Eficaz
MACROLIDOS			
Azitromicina	0.1 - 1	Taquizoíto	No Eficaz
Claritromicina	0.1 - 1	Taquizoíto	No Eficaz
Eritromicina	0.1 - 1	Taquizoíto	No Eficaz
TETRACICLINAS			
Doxiciclina	0.1 - 1	Taquizoíto	No Eficaz
Minociclina	0.1 - 1	Taquizoíto	No Eficaz
LINCOSAMIDAS			Coccidiostato 100%
Clindamicina HCl	0.01	Taquizoíto	Sí
Clindamicina Fosfato	0.1	Taquizoíto	Sí
Lincomicina HCl	0.1	Taquizoíto	No Eficaz
OTROS			
Arprinocid	10	Taquizoíto	No Eficaz
Nitrofurazona	1 - 10	Taquizoíto	No Eficaz
Robenidina	0.01 - 1	Taquizoíto	No Eficaz
Diclazuril	0.001 - 0.1	Taquizoíto	No Eficaz
Decoquinato	0.00005 - 0.001	Taquizoíto	No Eficaz
Amprolio	10 - 100	Taquizoíto y Bradizoíto	No Eficaz
Metronidazol	100	Taquizoíto	No Eficaz
Paramomicina	100	Taquizoíto	No Eficaz

Apéndice 6. Eficacia de combinaciones de Sulfonamidas y los Inhibidores de Dihidrofolato Reductasa/Timidilato Sintetasa (DHFR/TS) contra taquizoítos de *Neospora caninum* (Nc – 1) en cultivo celular. Tomado de: Dubey, J. P. y D. S. Lindsay. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol. 67: 34.

SULFONAMIDA 10 ug/ml	DIAPERIDINA 1.0 ug/ml	METOTREXATO 10.0 ug/ml	ORMETOPRIM 0.1 ug/ml	PIRIMETAMINA 0.01 ug/ml	TRIMETOPRIM 1.0 ug/ml
Sulfadiazina	100	12	20	100	100
Sulfadimetoxina	100	ND	41	91	100
Sulfameracina	100	ND	84	61	96
Sulfametacina	100	ND	100	93	100
Sulfaquinoxalina	96	10	42	41	0
Sulfatiazol	100	10	100	100	100