



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA NEOSPOROSIS BOVINA
DEL RODEO LECHERO EN EL URUGUAY**

MACCHI, MARÍA VALENTINA

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2019**

ESTA HOJA VA EN BLANCO



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA NEOSPOROSIS BOVINA
DEL RODEO LECHERO EN EL URUGUAY**

MACCHI, MARÍA VALENTINA

Andrés Gil
Director de Tesis

José Piaggio
Co-director

2019

(Esta hoja se completará una vez se defienda la Tesis y se apruebe)

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**

**EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL
ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

En esta hoja va el Informe del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

- A Andrés Gil y José Piaggio por darme la oportunidad de realizar este trabajo y orientarme durante mi formación.
- A Alejandra Suanes, Ximena Salaberry y todo el equipo técnico del Dilave por el apoyo y colaboración durante el proyecto.
- A Federico Fernandez por el apoyo y dirección del proyecto “Factores de dinámica poblacional y geo-ecológicos asociados a las enfermedades reproductivas”.
- A la ANII por la financiación de la beca de maestría.
- A biblioteca por su disponibilidad a la hora de solicitar bibliografía.
- A mi familia y amigos por acompañarme y apoyarme durante esta etapa.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	v
SUMMARY	vi
CAPÍTULO I: Antecedentes Específicos	1
1. INTRODUCCIÓN	1
2. CICLO BIOLÓGICO	1
2.1. Hospederos	3
3. TRANSMISIÓN	5
4. PATOGENIA.....	7
5. SIGNOS CLÍNICOS EN BOVINOS	9
5.1. Terneros.....	10
6. RELACIÓN HOSPEDERO-PARÁSITO	11
7. PATOLOGÍA.....	12
8. DIAGNÓSTICO	12
8.1. Métodos directos	12
8.2. Métodos indirectos	13
8.3. Diagnóstico de aborto.....	16
9. EPIDEMIOLOGÍA	18
9.1. Epidemiología del aborto	18
9.2. Prevalencia.....	20
9.3. Factores de riesgo.....	23
10. INFECCIÓN EN HUMANOS.....	31
11. PÉRDIDAS ECONÓMICAS	31
12. TRATAMIENTO	33
13. PREVENCIÓN Y CONTROL	34
13.1. Control de transmisión horizontal	35
13.2. Control de transmisión vertical	36
13.3. Uso de herramientas diagnósticas	38
13.4. Vacunación.....	38
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
CAPÍTULO II: Caracterización del problema	53
Objetivos	54
OBJETIVO GENERAL.....	54
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54

CAPÍTULO III: Seroprevalencia de la neosporosis bovina en el rebaño lechero del Uruguay	55
RESUMEN.....	55
SUMMARY	556
INTRODUCCIÓN.....	567
MATERIALES Y MÉTODOS	57
RESULTADOS.....	59
DISCUSIÓN	60
CONCLUSIÓN	61
BIBLIOGRAFÍA.....	61
CAPÍTULO IV: Factores asociados a la neosporosis bovina en el rebaño bovino lechero del Uruguay	65
RESUMEN.....	65
SUMMARY	65
INTRODUCCIÓN.....	66
MATERIALES Y MÉTODOS	67
RESULTADOS.....	70
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIÓN	74
BIBLIOGRAFÍA.....	74
CONCLUSIONES GENERALES	78

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Distribución de bovinos, vacas adultas y predios lecheros del Uruguay según estrato de población bovina (año 2015).....	58
Tabla II. Seroprevalencia individual de <i>Neospora caninum</i> según estratos de población bovina (año 2015).....	59
Tabla III. Resumen de preguntas realizadas a productores de 102 predios lecheros para identificar factores asociados a altos niveles de seroprevalencia con <i>Neospora caninum</i>	68
Tabla IV. Variables con $p \leq 0,2$ en el análisis univariado que fueron tenidas en cuenta para introducir en el análisis multivariado.....	71
Figura 1. Mapa del Uruguay con la distribución de la totalidad de los predios lecheros. Los diferentes colores discriminan predios muestreados (●) y no muestreados (●) para el estudio de seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i>	57
Figura 2. Distribución de predios lecheros del Uruguay según su seroprevalencia intra-rodeo de <i>Neospora caninum</i> (año 2015).....	59
Figura 3. Difusión de <i>Neospora caninum</i> en rebaños lecheros del Uruguay según estrato de población bovina (media + error estándar) ($p=0,11$) (año 2015).....	60
Figura 4. Número de hembras que ingresan anualmente a los predios lecheros de acuerdo al estrato de población bovina ($p < 0,01$).....	70

RESUMEN

La neosporosis bovina es una enfermedad ocasionada por *Neospora caninum*. Hoy en día, presenta una distribución a nivel mundial, adquiriendo importancia en la última década por ser una de las principales causas de aborto en los bovinos. El objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en los rebaños bovinos lecheros del Uruguay y buscar la existencia de posibles factores asociados a esta enfermedad. Para esto se realizó un muestreo aleatorio estratificado bietápico en el segundo semestre del año 2015; en la primera etapa fueron seleccionados 102 predios lecheros, de acuerdo al tamaño de población bovina (1 a 50 bovinos, 51 a 250 bovinos, más de 250 bovinos), y en la segunda etapa se seleccionaron de forma aleatoria sistemática hasta 60 vacas adultas por predio. Además de coleccionar las muestras de los animales en el predio se les realizaba una encuesta y un estudio de población a los productores. Por otro lado, se contó con los datos de entradas de bovinos el año previo al muestreo (julio 2014 a julio 2015), las coordenadas geográficas y resultados de seroprevalencia en cada predio de diarrea viral bovina, leucosis bovina enzootica y rinotraquitis infecciosa bovina. La serología se determinó por medio de la prueba ELISA indirecto (kit comercial), bajo las recomendaciones del fabricante en un total de 4.223 bovinos. Para determinar los factores asociados a los seropositivos se consideró como caso a todos los predios con seroprevalencias intraprediales superiores a 20%. Primero se realizó un análisis univariado, y aquellas variables con $p \leq 0,2$ fueron tenidas en cuenta para ser incluidas en el modelo multivariado de regresión logística. La seroprevalencia aparente estimada proyectada a la población de bovinos en función del diseño fue de $22,3 \pm 1,8$ % (intervalo de confianza (IC) 95%, 18,7-25,9 %), con una prevalencia a nivel predial de $96,0 \pm 1,9$ % (IC 95%, 92,1-99,8%). Dicha prevalencia predial tendió a aumentar a medida que el tamaño de los predios también lo hacía ($p=0,11$). Por otro lado, la prevalencia intra predial tuvo una amplitud de variación entre 0 y 53,3 % (mediana 23,1 %). Para el análisis multivariado nueve variables fueron tenidas en cuenta, pero sólo una de ellas demostró estar asociada en el modelo. El número de perros en los predios lecheros se encontró asociado a los niveles de infección, por cada perro adicional presente en el predio el riesgo de tener seroprevalencias superiores a 20% aumentaba 1,43 veces (OR=1,43; $p=0,04$), con un IC 95 de 1,02 a 2,03. Con este estudio se concluyó que si bien la seroprevalencia individual se ha mantenido estable con los años, hay una alta difusión del agente en los rebaños lecheros del país; a pesar de que este trabajo arrojó evidencia de que los perros son un importante factor a controlar para intentar reducir los niveles de infección en los predios, más estudios se deberían realizar, con un mayor número de establecimientos, para conocer mejor la epidemiología de la enfermedad y así elaborar medidas de control eficientes.

SUMMARY

Bovine neosporosis is a disease caused by *Neospora caninum*. Nowadays has a worldwide distribution becoming important in the last decade because it is one of the main causes of abortion in cattle. The aim of this study was to determine the seroprevalence of *Neospora caninum* in the dairy cattle of Uruguay and to look for the existence of possible associated factors with this disease. In the second semester of 2015; a cross-sectional study was developed with a two steps random sample: in the first step, dairy herds were divided into three strata according to the bovine population size (from 1 to 50, 51 to 250 and more than 250 cattle). In the second step, until 60 dairy cows were sampled within each herd. In addition to collecting the blood of the animals in the herds, a survey and a population study were carried out to the herdpersons. On the other hand, the in degree data were available for the sampling previous year (July 2014 to July 2015), geographic coordinates and seroprevalence in each herd of bovine viral diarrhea, bovine leukosis enzootia and infectious bovine rhinotracheitis. A total of 4223 serum samples were analyzing by indirect ELISA test (comercial kit), under the manufacturer's recommendations. In order to determine the factors associated with the disease, all herds with intra-herd seroprevalence higher than 20% were considered as a case. First, a univariate analysis was carried out, and those variables with $p \leq 0.2$ were taken into account to be included in the multivariate logistic regression model. Dairy cow apparent seroprevalence of *N. caninum* was 22.3 ± 1.8 % (95% confidence interval (CI), 18.7-25.9 %), and at herd level was 96.0 ± 1.9 % (95% CI, 92.1-99.8%). Herd seroprevalence tended to increased when the size of the herd increased ($p=0.11$). In addition, intra-herd seroprevalence was calculated, having a range between 0 and 53.3% (median of 23.1%). For the multivariate analysis, nine variables were taken into account, but only one variable showed significant association in the model. The number of dogs in the dairy farms was found associated with infection levels, for each additional dog present in the farm the risk of having seroprevalences higher than 20% increased 1.43 times (OR = 1.43, $p=0.04$), with an IC 95 of 1.02 to 2.03. With this study, it was concluded that although the individual seroprevalence has remained stable over the years, there is a high diffusion of the agent in the dairy herds of the country. Although this work showed evidence that dogs are an important factor to control in order to reduce the levels of infection in the farms, more studies should be conducted, with a greater number of dairy herds, to better understand the epidemiology of the disease and thus develop efficient control measures.

CAPÍTULO I: Antecedentes Específicos

1. INTRODUCCIÓN

La neosporosis bovina es una enfermedad poli sistémica causada por *Neospora caninum* (*N. caninum*), un protozoario intracelular obligado del phylum Apicomplexa, clase Coccidia (Dubey *et al.*, 1988).

Neospora caninum fue descrito por primera vez en perros con encefalomiелitis y miositis en 1984 (Bjerkas *et al.*, 1984), pero no fue hasta 1988 que Dubey *et al.* (1988) lo describieron como una nueva especie. Antes de esta fecha el parásito era mal diagnosticado como *Toxoplasma gondii* una coccidia con características similares, pero como después se describirá, patógenos muy diferentes (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey *et al.*, 2002). En los bovinos, Thilsted y Dubey (1989) fueron los primeros en reportar *N. caninum* en tejidos nerviosos de fetos en rodeos con problemas de abortos esporádicos en Nuevo México (Dubey y Lindsay, 1996).

Hasta la fecha, se han logrado diferentes aislamientos de *N. caninum*, encontrando una gran variabilidad en su virulencia (patogenicidad) y rangos de crecimiento (Donahoe *et al.*, 2015).

Otra especie de *N. caninum* fue identificada en 1998 por Marsh *et al.* (1998), *Neospora hughesi*; éstos investigadores la clasificaron tanto molecular como antigénicamente, describiendo su presencia únicamente en equinos, (Dubey, 1999; Almería, 2013), en los que causa la denominada mieloencefalitis protozoaria equina (Marsh, 1998 citado por Martínez *et al.*, 2015). No hay reportes en la bibliografía que este haya sido aislada en América del sur (Martínez *et al.*, 2015).

Hoy en día la neosporosis bovina es considerada una enfermedad de distribución mundial (Dubey y Schares, 2011), que ha venido adquiriendo importancia por las pérdidas económicas que ocasiona, ya que es una causa importante de aborto en bovinos (Dubey y Lindsay, 1996).

2. CICLO BIOLÓGICO

Neospora caninum tiene un ciclo biológico heteroxeno (Dubey *et al.*, 2006; Goodswen *et al.*, 2013), en donde los hospederos definitivos son los perros (*Canis familiaris*) (McAllister *et al.*, 1998), coyotes (*Canis latrans*) (Gondim *et al.*, 2004b), lobo gris (*Canis lupus*) (Dubey *et al.*, 2011) y dingos (*Canis lupus dingo*) (King *et al.*, 2010); mientras que los bovinos y un amplio rango de animales de sangre caliente (Dubey *et al.*, 2006), incluso los mismos caninos (Dubey, 1999), pueden actuar como hospederos intermediarios (Dubey *et al.*, 2006).

En el proceso infeccioso de *N. caninum* están descritas tres etapas: la de los taquizoitos, bradizoitos y de los esporozoitos; en las cuales ocurren dos formas de reproducción (Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2006; Monney y Hemphill, 2014). Los taquizoitos y bradizoitos se encuentran a nivel intracelular en los tejidos del hospedero intermediario (Dubey, 1999; Dubey *et al.*, 2006), en donde toma lugar la reproducción asexual; mientras que los esporozoitos son excretados por el hospedador definitivo, en donde se

da la reproducción sexuada (Dubey *et al.*, 2006; Almería, 2013; Almería y López-Gatius, 2013).

Los esporozoitos, derivan de los ooquistes no esporulados que liberan los perros infectados, u otro hospedero definitivo, a través de su materia fecal. Éstos son la forma más resistente del parásito, ya que resisten a la desecación y frío (Lindsay *et al.*, 1999), teniendo un diámetro aproximado de 10-12 μm (Williams *et al.*, 2009). Una vez en el ambiente, luego de transcurridas 24 horas, éstos esporulan, conteniendo en su interior dos esporocistos con cuatro esporozoitos cada uno (Dubey, 1999; Lindsay *et al.*, 1999). El hecho de que los ooquistes sean altamente resistentes lleva a que sean un punto clave en la epidemiología de la neosporosis bovina (Dubey y Schares, 2011).

Previo a la liberación de los ooquistes, es fundamental que el hospedero definitivo se infecte a través de la ingestión de tejidos de hospederos intermediarios con bradizoitos o taquizoitos (Buxton *et al.*, 2002; Almería y López-Gatius, 2013). Una vez ingerido, tarda en promedio 5 días en comenzar a liberar ooquistes no esporulados por medio de la materia fecal (período pre-patente) (Lindsay *et al.*, 1999). Esta liberación ocurre durante 1 a 27 días aproximadamente, pero es variable junto con la cantidad de ooquistes liberados al medio (Dubey *et al.*, 2007). El número de ooquistes excretados usualmente es pequeño (Gondim *et al.*, 2005; Dubey y Schares, 2011) y esta liberación disminuye progresivamente con la edad (Schaes *et al.*, 2005 citado por Goodswen *et al.*, 2013); siendo que los cachorros liberan mayor cantidad de ooquistes que los adultos. Luego de este período de excreción, los perros parecerían volverse refractarios a la eliminación de ooquistes, al menos durante ocho a 18 meses (Gondim *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2007).

Como mencionamos anteriormente, los taquizoitos y bradizoitos son las fases que se dan en el hospedero intermediario una vez que éstos ingieren ooquistes esporulados (De Marez *et al.*, 1999; Donahoe *et al.*, 2015). En el tracto gastrointestinal los esporozoitos parasitan el intestino, en donde pasan a taquizoitos, éstos últimos son capaces de invadir una gran variedad de células nucleadas (Dubey *et al.*, 2006).

Los taquizoitos son las formas de multiplicación rápida, produciendo lesiones en los tejidos por la multiplicación y ruptura celular (Buxton *et al.*, 2002), pudiendo diseminarse por todo el cuerpo del hospedero intermediario (Anderson *et al.*, 2000). Tienen forma ovoide o globular, midiendo 3-7 x 1-5 μm , dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren, la que se da por endodiogenia (Dubey y Lindsay, 1996). Éstos, penetran a las células mediante invasión activa luego de cinco minutos que comienzan el contacto (Hemphill *et al.*, 1996 citado por Dubey y Lindsay, 1996), se han encontrado hasta 100 taquizoitos en una única célula (Dubey y Lindsay, 1996). Se los pueden hallar en una gran variedad de tejidos, principalmente en células de origen nervioso, macrófagos, fibroblastos, células del endotelio vascular, miocitos, células del epitelio tubular renal, hepatocitos (Dubey *et al.*, 1988) y trofoblastos placentarios (Dubey *et al.*, 2002). Se localizan dentro de una vacuola parasitófora dentro del citoplasma celular (Dubey *et al.*, 2002), la que deriva de la propia membrana celular de la célula huésped que es

modificada por el parásito previamente a la invasión para prevenir la fusión endocítica con otros organelos (Hemphill *et al.*, 1996 citado por Monney y Hemphill, 2014).

Esta fase de multiplicación rápida de *N. caninum* es la que se determina como la fase aguda de la enfermedad, diseminándose por el torrente sanguíneo y linfático a los diferentes tejidos del animal e induciendo la muerte celular (Davison *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2007; Goodswen *et al.*, 2013). En el caso en que el hospedero carezca de respuesta inmune, los taquizoitos continuarían su proceso de multiplicación hasta causar la muerte del animal la cual se produciría a causa de la muerte celular (Buxton *et al.*, 2002). Sin embargo, en un animal con una correcta respuesta inmune, la rápida replicación del taquizoito *in vivo* es limitada a 20 divisiones aproximadamente, las que se dan en un período de tres semanas; luego de las cuales los taquizoitos se diferencian a bradizoitos (Dubey y Lindsay, 1996 citado por Goodswen *et al.*, 2013). Entonces, la ocurrencia de la destrucción celular y por ende la presencia de enfermedad, depende del balance entre la multiplicación y penetración de los taquizoitos y la habilidad que tiene el hospedero de inhibir la multiplicación y diseminación de esta forma infecciosa (Buxton *et al.*, 2002).

Los bradizoitos a pesar de que también se multiplican por endodiogenia, lo hacen de forma lenta (Buxton *et al.*, 2002). Son muy similares morfológicamente a los taquizoitos (Almería, 2013), teniendo un núcleo subterminal y midiendo 8X2 μm (Dubey *et al.*, 2002), pero están comprendidos dentro de un quiste tisular que es redondeado u oval, que puede medir más de 100 micras (Dubey y Lindsay, 1996), dependiendo la cantidad de bradizoitos que contenga en su interior (Dubey *et al.*, 2006). El principal tejido en donde se alojan es el sistema nervioso central incluida la retina, y de forma secundaria en el tejido muscular esquelético (Dubey *et al.*, 1990 citado por Goodswen *et al.*, 2013), pudiendo persistir en el hospedero de por vida sin manifestar signos clínicos (Dubey y Lindsay, 1996). Los quistes tisulares con los bradizoitos contenidos en su interior se forman básicamente ante la reacción de los taquizoitos a la respuesta inmune del hospedero, siendo la forma de infección persistente, crónica y asintomática (Dubey *et al.*, 2007).

El ciclo biológico del parásito se completa cuando el quiste tisular presente en el hospedero intermediario es ingerido por el canino, los quistes pueden sobrevivir a los jugos gástricos del estómago, pasando intactos al intestino delgado, en donde los bradizoitos se liberan e invaden las células, comenzando el ciclo nuevamente (Goodswen *et al.*, 2013).

2.1. Hospederos

Si bien *N. caninum* es un protozooario reconocido por su preferencia de infección a bovinos y caninos, en los últimos años se han reportado infecciones y/o evidencias serológicas en varias especies vertebradas de sangre caliente (Dubey *et al.*, 2002; Donahoe *et al.*, 2015), tanto en animales domésticos, salvajes como de zoológico (Almería y López-Gatius, 2013). De todas maneras, si bien se han encontrado evidencias serológicas en múltiples especies, para la confirmación de una especie animal como hospedero intermediario es necesario detectar el parásito o ADN del mismo

en el cuerpo del animal (de Barros *et al.*, 2018).

A la fecha, los únicos hospedadores definitivos que han sido demostrados son los perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) (McAllister *et al.*, 1998), el lobo gris (*Canis lupus*) (Dubey *et al.*, 2011), el dingo (*Canis lupus dingo*) (King *et al.*, 2010) y los coyotes (*Canis latrans*) (Gondim *et al.*, 2004b). Los coyotes de Norte América fueron los primeros caninos salvajes confirmados como hospedador definitivo, éstos se encuentran en EEUU, parte de Canadá y América central (Gondim *et al.*, 2004b). El lobo gris fue el canino silvestre más reciente que se confirmó como un hospedero definitivo natural de *N. caninum* en EEUU (Dubey *et al.*, 2011). Por otro lado, en Australia se logró infectar artificialmente a un cachorro dingo con un aislado de *N. caninum*, Nc-Nowra encontrándose ooquistes en sus heces (King *et al.*, 2010). En el caso de los perros, se ha reportado una susceptibilidad para la infección en las razas Golden retrievers, Labrador, Boxer, Galgos y Basset hounds, pero no se han encontrado diferencias según las edades, aunque los casos clínicos más severos ocurren en jóvenes o cachorros con infección congénita (Buxton *et al.*, 2002). De todos modos, investigaciones sobre el tema parecerían indicar que el perro si bien es el hospedero definitivo más importante de América Latina (Dubey y Schares, 2011), la transmisión horizontal no es la predominante en esta especie, siendo la vía transplacentaria y lactogénica las de mayor importancia (Cerdillo *et al.*, 2008; Bandini *et al.*, 2011).

En cuanto al hospedero intermediario, cada vez se realizan más estudios sobre su reconocimiento, hoy en día se sabe que *N. caninum* es capaz de, si se da la oportunidad, invadir casi cualquier especie de sangre caliente (Goodswen *et al.*, 2013). Evidencia de infección natural fue encontrada en perros, bovinos, ovinos, caprinos, equinos y cérvidos (Dubey y Lindsay, 1996). Sin embargo, la infección natural en ovinos y caprinos es muy poco común (Dubey *et al.*, 1996 citado por Buxton *et al.*, 2002), pero la inoculación experimental de este patógeno durante la preñez puede causar una patología muy similar a la que ocurre con el ganado bovino. Sólo algunos casos de neosporosis clínica (EEUU y Francia) se han reportado en equinos, pero no se determinó de forma concreta si se trataba de *N. caninum*, *N. hughesi* o ambos. Es muy probable que éstos animales sólo sucumban a la infección cuando su sistema inmunitario se encuentre muy deprimido. Por el contrario, en los porcinos la infección natural no se ha descrito (Buxton *et al.*, 2002).

Si bien no todas las aves han demostrado ser hospederos intermediarios naturales de *N. caninum*, las aves de corral (*Gallus domesticus*) y los gorriones (*Passer domesticus*), entre otros, han sido confirmadas como tales al lograr detectar la presencia de ADN del parasito en varios tejidos (de Barros *et al.*, 2018). Éstas son concideradas las más relevantes, dado que son las que tienen mayor contacto con los bovinos en distintos sistemas de producción y también actúan como reservorio para la transmisión a caninos. De todas maneras, el rol de éstos animales en el ciclo biológico del protozooario aún no se entiende completamente. Una hipótesis es que éstas aves carguen en sus patas y plumas los ooquistes y los diseminen en el ambiente, actuando como vectores mecánicos del protozooario (Almería, 2013).

Los primeros rumiantes silvestres que se reportaron infectados por *N. caninum* fueron los cérvidos, lográndose encontrar bradizoitos en el cerebro de éstos animales en un zoológico de la ciudad de París (Dubey *et al.*, 1996 citado por Almería, 2013). Por otro lado, en España Sobrino *et al.* (2008) encontraron la presencia de *N. caninum* en gatos salvajes y otros animales carnívoros silvestres. Éstos animales se encontraban en una gran variedad de hábitats, principalmente en montes con escasa presencia de humanos, actuando como hospederos intermediarios de este protozooario y perpetuando la infección en el medio. Se ha visto que los roedores tales como ratas y ratones cerca de los predios también pueden ser posibles hospederos intermediarios (Almería, 2013); al igual que los conejos salvajes (Hughes *et al.*, 2008).

En mamíferos acuáticos, varios estudios epidemiológicos han mostrado que se puede detectar la presencia de *N. caninum*, tanto en especies marinas como de río (Almería, 2013). Pero aún no se ha determinado si éstos animales son o no hospederos intermediarios (Godim *et al.*, 2006 citado por Almería, 2013). En cambio, si bien se ha logrado infectar a primates de forma experimental, la evidencia de infección en humanos es muy escasa (Dubey *et al.*, 2006).

3. TRANSMISIÓN

En bovinos, existen dos modelos de transmisión fundamentales para la supervivencia de *N. caninum* (Dubey y Schares, 2011). La transmisión horizontal, que como ya mencionamos, ocurre por medio de la ingestión posnatal de alimentos o agua contaminada con ooquistes esporulados (Dubey *et al.*, 2006) y la vertical o transplacentaria en donde la vaca gestante infectada le transmite la infección al feto (Dubey, 2003). Una vez que un bovino se infecta (ya sea vía horizontal o vertical) permanecerá infectado de por vida (Dubey *et al.*, 2006).

Neospora caninum es uno de los microorganismos más eficientes en la transmisión transplacentaria en el ganado bovino (Almería y López-Gatius, 2013). Si bien esta infección puede resultar en aborto, por encima del 95% de las veces nace un ternero clínicamente sano, pero persistentemente infectado (Dubey *et al.*, 2006). Éstos terneros, serán los encargados de mantener la infección en el rodeo, dado que transmitirán *N. caninum* de forma vertical a sus futuras crías (Piergili-Fioretta *et al.*, 2003 citado por Almería y López-Gatius, 2013), ya sea de forma continua o intermitente (Dubey y Lindsay, 1996). Es por este motivo, que los investigadores afirman que este tipo de transmisión es la responsable de la difusión y persistencia del protozooario en el rodeo en las sucesivas generaciones (Dubey *et al.*, 2006).

La transmisión vertical no sólo es la principal ruta de infección en bovinos domésticos, sino que también lo es en otras especies de bovinos (como por ejemplo búfalos) y en la mayoría de los rumiantes salvajes como los cérvidos. De todas maneras, la importancia de la transmisión vertical en el mantenimiento de la infección en los animales silvestres aún es desconocida (Almería, 2013).

Se describen básicamente dos tipos de transmisión transplacentaria:

exógena y endógena, que varían dependiendo del origen de la infección al feto. La transmisión transplacentaria exógena se da cuando una vaca preñada libre de infección se infecta por primera vez, a través de la ingestión de ooquistes esporulados (transmisión horizontal), mientras que la de tipo endógena sucede cuando se reactiva la infección en una vaca preñada persistentemente infectada (infección crónica) (Williams *et al.*, 2009). La reactivación de los bradizoitos a taquizoitos (recurrencia de la infección aguda) puede ocurrir ante cambios en el estado inmune del hospedero (inmunomodulación o inmunosupresión), y en el caso de los animales preñados es cuando sucede la diseminación a través de la placenta infectando al feto (Williams *et al.*, 2009), siendo así los taquizoitos la forma de infección hacia el feto (Almería y López-Gatius, 2013). Se ha logrado encontrar la presencia de *N. caninum* en fetos abortados 31 días post inoculación de taquizoitos a vacas gestadas (Dubey *et al.*, 1992 citado por Dubey, 1999).

Los distintos tipos de transmisión transplacentaria (endógena y exógena) tienen diferentes consecuencias epidemiológicas, inmunitarias y sobre el control (Piaggio *et al.*, 2007). Williams *et al.* (2009) determinaron que vacas persistentemente infectadas transmitirán la infección a sus crías en las sucesivas preñeces, no generando un grado de inmunidad suficientemente fuerte contra la infección endógena. Por el contrario, en el caso de la infección exógena, las vacas sí serían capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria tal que evitaría la transmisión de la infección en las futuras preñeces. En vacas infectadas, se ha descrito que a mayor título de anticuerpos al servicio o previo a la preñez mayor será la probabilidad de parir terneros infectados; esto podría ser tomado como predictor de la transmisión vertical, pudiendo utilizarse como medida de control en predios problema (Moré *et al.*, 2009).

A pesar de la importancia de la transmisión vertical, la infección en el rodeo no podría persistir sin la transmisión horizontal (Dubey *et al.*, 2006), aunque sea en bajos niveles. Dado que, como se reportó, la eficiencia de la transmisión vertical está por debajo del 100%, y únicamente con esta vía de infección *N. caninum* iría con el pasar de las generaciones disminuyendo su prevalencia en el rodeo (Dubey *et al.*, 2007). Usualmente, la transmisión horizontal en el ganado ocurre con baja frecuencia (<5%), a excepción de los casos de brotes de aborto, en los que haya evidencia de que la infección fue provocada por una fuente de infección medioambiental (Piaggio *et al.*, 2007).

La ingestión de ooquistes por parte de los bovinos, ha sido la única vía de transmisión horizontal que se ha demostrado (Dubey *et al.*, 2007), ya que la transmisión horizontal entre bovinos no es posible (Dubey y Schares, 2011; Almería, 2013; Goodswen *et al.*, 2013). Por otro lado, se logró demostrar la transmisión de animales salvajes a domésticos, en donde los ciervos son fuente de infección para perros, diseminando de esta manera luego la infección al rodeo (Gondim *et al.*, 2004a).

A lo largo de los años se ha estudiado la posible existencia de otras vías de transmisión, además de las mencionadas previamente, surgiendo la vía lactogénica, venérea (Dubey y Schares, 2011) y por la transferencia de

embriones (Baillargeon *et al.*, 2001). Hasta la fecha, no se han encontrado reportes con evidencia de que la infección por vía lactogénica ocurra de forma natural (Ortega-Mora *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007). Si bien Davison *et al.* (2001) adicionaron taquizoitos en calostro y leche de terneros logrando la seroconversión de éstos, esta ruta de infección es poco probable que se de en condiciones naturales. A la vez, perros alimentados con leche con taquizoitos no eliminaron ooquistes a través de sus heces (Dijkstra *et al.*, 2001 citado por Dubey, 2003). De igual manera, tampoco se ha logrado demostrar la transmisión venérea por parte de este protozooario a través del semen (Almería y López-Gatius, 2013). Si bien Serrano *et al.* (2006) y Serrano-Martínez *et al.* (2007) lograron infectar a vacas inseminadas con semen infectado, se precisó una gran dosis de taquizoitos en el semen para lograrlo, no siendo reproducible en condiciones naturales y desconociéndose la viabilidad de los taquizoitos en el semen bovino y la mínima dosis infectiva. Por otro lado, Ferre *et al.* (2008) no lograron alcanzar un número de taquizoitos en semen tal que fuera suficiente para infectar a la hembra servida.

De todas formas, ésta es una vía de infección que no se debe descuidar totalmente, dado que se ha observado la presencia esporádica del ADN de *N. caninum* en la fracción celular del semen, tanto en fresco como en congelado (Ortega-Mora, 2003). En cuanto a la transferencia de embriones, es una vía de infección que resulta muy poco probable, tanto es así que la transferencia de embriones es un método recomendado para controlar la transmisión transplacentaria endógena (Baillargeon *et al.*, 2001).

4. PATOGENIA

La neosporosis bovina es una enfermedad que afecta tanto al feto como a la placenta, pudiendo estar ocasionada por una infección primaria (exógena) o, lo que ocurre con mayor frecuencia, por una reinfección de vacas persistentemente infectadas (endógena) durante la gestación (Dubey *et al.*, 2006).

La infección al feto por una infección primaria de la vaca, es la que previamente fue denominada como transmisión transplacentaria exógena, donde la vaca gestante se infecta a causa de la ingestión de ooquistes esporulados. Cuando éstos llegan al intestino los esporozoitos son liberados e invaden las células intestinales, transformándose en taquizoitos. En esta fase es cuando ocurre la multiplicación rápida, en donde se replican en los ganglios mesentéricos para luego invadir el torrente sanguíneo, esta parasitemia lleva a que el protozooario se disemine por múltiples tejidos, incluyendo el útero grávido (Dubey *et al.*, 2006).

En el caso de la transmisión transplacentaria endógena, las vacas ya están infectadas al momento del servicio, dado que son las denominadas persistentemente infectadas (infección crónica). En éstas vacas *N. caninum* se encuentra latente en el SNC (sistema nervioso central) y músculo esquelético, en forma de bradizoitos (fase de multiplicación lenta), en perfecta armonía con su sistema inmunitario (Dubey *et al.*, 2006). Durante la gestación sufren una reactivación de la enfermedad, desencadenado posiblemente por la baja de inmunidad que ocurre hacia la mitad de la gestación (Innes *et al.*, 2005). Aunque es razonable pensar que la

inmunosupresión que sufre la hembra durante la gestación es lo que lleva a la reactivación de la infección, este mecanismo no ha sido demostrado para el caso de *N. caninum* (Dubey, 2003). El momento en el que ocurre la reactivación de la enfermedad será clave para determinar el resultado de la preñez (Williams *et al.*, 2000; Guy *et al.*, 2001).

Una vez que los taquizoitos comienzan a circular por el torrente sanguíneo materno (parasitemia), *N. caninum* es capaz de establecerse en el septum de las carúnculas maternas, antes de pasar al feto (Dubey *et al.*, 2006). En el útero grávido, comienza a multiplicarse causando una destrucción celular focal en tejidos maternos, fetales y en la interface materno-fetal, en tanto se inicia una respuesta inflamatoria por parte de éstos tejidos (Buxton *et al.*, 2002). El riesgo de transmisión y el daño fetal está muy relacionado con la edad gestacional al momento de infección, la probabilidad de transmisión aumenta con la edad gestacional, esto puede relacionarse con la vascularización de la placenta, dado que esta es más permeable el último trimestre de gestación (Dubey y Schares, 2011).

Luego de una infección primaria en el feto, el IFN-gamma activa una respuesta pro inflamatoria de macrófagos u otras células mononucleares que inducen la diferenciación de taquizoitos a bradizoitos formando los quistes tisulares (Williams *et al.*, 2009 citado por Goodswen *et al.*, 2013). Esto dependerá también de la edad gestacional, la inmunocompetencia del feto al momento de infección (Innes *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2006) y las particularidades de la cepa actuante (Maley *et al.*, 2003).

El sistema inmune del feto se desarrolla de forma progresiva durante la gestación, para al nacimiento ser inmunocompetente (Dubey *et al.*, 2006). Durante el primer tercio de la gestación el feto es particularmente vulnerable, cuando el timo, bazo y ganglios linfáticos periféricos se están comenzando a formar (Goodswen *et al.*, 2013). Éstos tejidos comienzan a responder ante patógenos luego del segundo tercio de la gestación. Desde los 100 a 150 días de gestación el sistema inmune del feto comienza a ser capaz de responder ante la invasión de diferentes tipos de microorganismos, tornándose cada vez más eficiente (Osburn, 1986 citado por Dubey *et al.*, 2006). Es por este motivo que durante el primer tercio de la gestación el feto es particularmente sensible a la infección con *N. caninum*, siendo poco probable que sobreviva, y a medida que la gestación avanza se vuelve más resistente ante la infección, disminuyendo la probabilidad de aborto (Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2006).

A partir del segundo tercio de gestación el feto es capaz de generar una respuesta inmune rudimentaria, evidenciada por la presencia de anticuerpos en suero de fetos abortados, pero claramente esta respuesta puede no ser suficiente, teniendo en cuenta que la mayoría de los abortos a causa de neosporosis ocurren durante este período (Maley *et al.*, 2003). De forma general, en los fetos más jóvenes los taquizoitos se multiplicarán de forma descontrolada, causando posiblemente la muerte; en los de mayor edad la multiplicación será más restringida, por la mayor capacidad de responder ante infecciones que tendrá el feto (Buxton *et al.*, 2002). Es por eso que cuanto más temprano ocurra la parasitemia y la infección fetal, más peligroso será para el feto. Se encontraron lesiones en múltiples órganos

(cerebro, corazón, riñones y pulmón) en fetos con infecciones tempranas, mientras que aquellos que sufrieron la infección más tardíamente las lesiones se observaron sólo a nivel de cerebro (Innes, 2007). Siendo más probable el nacimiento de un ternero clínicamente sano pero persistentemente infectado cuando este se infecta en el último tercio de gestación (Guy *et al.*, 2001).

Para que el aborto suceda debe ocurrir un daño a nivel de placenta y/o feto de forma que al menos uno de éstos no pueda ser viable (Dubey *et al.*, 2006). *N. caninum* afecta inicialmente la placenta, causando una liberación de prostaglandinas por parte del útero materno que lleva a luteólisis y por ende al aborto (Dubey *et al.*, 2006). La muerte del feto, también puede ocurrir por la multiplicación del parásito en los tejidos fetales produciendo extensas lesiones en órganos vitales (Dubey y Schares, 2011), o bien, por una insuficiente nutrición y fuente de oxígeno por las alteraciones que se producen de forma secundaria en la placenta. De forma adicional, la expulsión del feto como resultado a la respuesta inmune materna puede ocurrir dada la inflamación placentaria y la liberación de citoquinas pro inflamatorias maternas (Dubey *et al.*, 2006).

Por todo lo anteriormente mencionado, se puede establecer que *N. caninum* es un patógeno primario causante de aborto, tanto por la inflamación y necrosis que produce en la placenta materna como por el daño ocasionado en los tejidos fetales, no considerado un patógeno oportunista (Dubey *et al.*, 2006).

5. SIGNOS CLÍNICOS EN BOVINOS

La neosporosis bovina es una causa muy importante de aborto, de todos modos, esta infección tipo crónica suele presentarse de forma subclínica en bovinos adultos (Dubey y Lindsay, 1996; Goodswen *et al.*, 2013), encontrándose asociado con la cepa de *N. caninum* presente (Dubey y Schares, 2011).

El aborto en los bovinos, tanto en ganado de carne como de leche (Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2006; Almería y López-Gatius, 2013), es el signo clínico más importante de la enfermedad y muchas veces el único visible (Goodswen *et al.*, 2013), puede ocurrir a cualquier edad de la hembra gestante (Dubey, 1996; Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011), no siendo característica la retención de placenta (Anderson *et al.*, 2000). Como signo clínico secundario, se han observado picos de fiebre bifásicos en vacas muy cercanamente monitoreadas que fueron inoculadas con *N. caninum* (Maley *et al.*, 2003), pero no se ha logrado observar en vacas con infección natural (Dubey *et al.*, 2006).

El aborto se produce principalmente a partir del tercer mes de gestación hasta los 9 meses, pero ocurre con mayor frecuencia durante el segundo tercio de gestación (5 a 7 meses) (Dubey, 1996; Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011). De todas maneras, la muerte fetal se da tan sólo en el 5% de los casos aproximadamente, siendo lo más frecuente la transmisión de la infección al feto sin la ocurrencia de aborto (Davison *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, la supervivencia del feto varía

ampliamente de acuerdo al momento en que se dé la infección *in útero*, estando relacionado con el desarrollo del sistema inmune fetal (Buxton *et al.*, 2002). Cuando la infección se da en los primeros dos meses de gestación, usualmente el feto es reabsorbido y la vaca vuelve a ciclar normalmente, observándose como una repetición de celo (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey *et al.*, 2006). Es importante mencionar que la neosporosis bovina no afecta la fertilidad de las vacas previo a la gestación (Almería y López-Gatius, 2013). Cuando la infección *in útero* ocurre entre los 3 a 8 meses de gestación, el feto puede morir y es expulsado con una moderada autólisis. Pero, en caso de que se produzca la muerte fetal antes de los 5 meses de gestación, el feto puede momificarse y ser retenido en el útero por varios meses (Dubey *et al.*, 2006). Por lo que, de acuerdo con la etapa de la gestación en la que se infecte el feto, este puede morir en el útero, ser reabsorbido, momificado, autolizado, nacer muerto, nacer vivo con signos de la enfermedad, o bien, clínicamente sano pero persistentemente infectado (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 1999; Dubey, 2003; Almería y López-Gatius, 2013).

Las vacas que abortan por primera vez no generan inmunidad, repitiéndose el aborto o el nacimiento de crías persistentemente infectadas con el correr de las gestaciones (Dubey y Lindsay, 1996; Anderson *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2005). De todas formas, es más probable que una vaca tenga más de un ternero congénitamente infectado a que repita el aborto (Dubey y Lindsay, 1996).

Si bien no se ha descrito la ocurrencia de infertilidad en vacas infectadas, Bahrami *et al.* (2018) demostraron que en toros infectados la concentración, motilidad y viabilidad espermática se encontraban disminuidas con respecto a toros sin la infección por este protozooario. Esto, según éstos autores, puede estar relacionado con la afección del SNC (más que nada con el alojamiento de *N. caninum* en hipotálamo), con la afección directa en tejidos testiculares o con la existencia de estrés oxidativo en los testículos de animales infectados (Bahrami *et al.*, 2018). Sería necesario estudiar de qué manera éstas afecciones en los parámetros espermáticos influyen en las tasas reproductivas de los rodeos bovinos.

5.1. Terneros

Los terneros que nacen de vacas infectadas, a pesar de que la gran mayoría nace sin signos clínicos aparentes (Anderson *et al.*, 2000), en el 95% de los casos están persistentemente infectados (Davison *et al.*, 1999). De todas maneras, se ha reportado en terneros menores de dos meses de edad signos nerviosos a causa de la infección *in útero* por *N. caninum* (Dubey, 1999), limitándose éstos signos únicamente al SNC (Dubey y Lindsay, 1996).

El desarrollo de los signos neurológicos, se da usualmente cuando la vía de infección es la transplacentaria exógena (Reichel *et al.*, 2014). Éstos terneros nacerán con bajos pesos vivos, debilidad (Dubey *et al.*, 2006) y gran dificultad para ponerse de pie que podrá llegar incluso hasta la parálisis completa (Dubey y Lindsay, 1996). Podrán sufrir tanto en uno como en los cuatro miembros laxitud de tendones o miembros hiperextendidos, ataxia, disminución del reflejo patelar, pérdida de la propiocepción, exoftalmia y asimetría aparente en los ojos (Dubey *et al.*, 2006). Aunque es poco

frecuente los defectos congénitos también está descrita la escoliosis, hidrocefalia y médula espinal bífida (Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2006).

6. RELACIÓN HOSPEDERO-PARÁSITO

Los eventos inmunológicos de mayor importancia que llevan al control de la infección por parte del bovino, haciendo que los taquizoitos se diferencien a bradizoitos, son: la destrucción de las células infectadas promoviendo la actividad de las células T (CD+4 y CD+8), inhibición de la multiplicación parasitaria por medio de las citoquinas IFN-gamma y TNF α , y bloqueando la entrada del parásito a través de los anticuerpos (Innes, 2007).

La respuesta inmune que desarrollan los bovinos ante la infección con *N. caninum* es básicamente de tipo celular (Innes *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2006); siendo mediada por las células T-helper tipo I, favoreciendo la liberación de citoquinas pro inflamatorias como IFN-gamma, TNF α y IL-12, que limitan e inhiben la multiplicación de los taquizoitos (Innes *et al.*, 2005).

A pesar de que la respuesta inmune de las células T-helper tipo I es muy importante para la protección contra *N. caninum* y otros patógenos intracelulares, también se los considera perjudiciales para la preñez, siendo en muchos casos fatal para el feto (Innes *et al.*, 2002). Se ha demostrado que algunas citoquinas en la interface materno fetal son beneficiosas, mientras que otras como las citoquinas pro inflamatorias IFN-gamma y TNF α no lo son (Entrican, 2002 citado por Innes *et al.*, 2005), dependiendo básicamente de su concentración y localización (Innes *et al.*, 2005).

Durante la gestación las células trofoblásticas del feto producen IL-10, que son importantes para estimular la generación de los linfocitos T-helper tipo II, favoreciendo el ambiente de la interface materno fetal (Innes *et al.*, 2002). Ese aumento en la concentración de IL-10 estimula la baja producción de IFN-gamma, generando la disminución de la respuesta inmune necesaria para combatir este protozoario entre los 4 y 6 meses de gestación, favoreciendo su multiplicación y por lo tanto la transmisión vertical de la enfermedad (Innes *et al.*, 2002). Por esto, es muy difícil para la vaca responder ante la infección de *N. caninum* y a la vez mantener la preñez, ya que por un lado la inmunomodulación natural que ocurre durante la preñez puede alterar la efectividad de controlar la infección y por el otro la respuesta inmune que sucede para combatir la infección puede de por sí comprometer la preñez (Innes *et al.*, 2005).

La presencia o no de aborto en un caso determinado depende de múltiples factores, los más importantes a considerar son la etapa de gestación en la que se encuentre el animal, la edad gestacional del feto y la magnitud de parasitemia que sufra la madre. La respuesta inmune celular ante *N. caninum* en una vaca preñada es eficiente hasta la mitad de la gestación, pero a medida que se acerca al parto la respuesta inmune disminuye. De todos modos, en el último tercio de la gestación el feto ya tendrá su propio sistema inmune desarrollado, siendo capaz de defenderse ante la infección en la gran mayoría de los casos (Buxton *et al.*, 2002).

La respuesta inmune del tipo humoral es considerada más que nada como un indicador indirecto de la exposición antigénica para el sistema inmune, un aumento de este título puede reflejar un aumento de la actividad parasitaria y

la multiplicación de *N. caninum* en el hospedero (Innes *et al.*, 2005; Innes, 2007). Se sabe que la respuesta inmune del tipo humoral fluctúa a lo largo de la preñez (Guy *et al.*, 2001). Un aumento de los anticuerpos en la mitad de la gestación estará más probablemente ligada a un aborto que un aumento de éstos al final de la gestación (Innes *et al.*, 2005).

7. PATOLOGÍA

Una vez que *N. caninum* invade el torrente sanguíneo fetal se disemina por varios tejidos, teniendo una especial predilección por el sistema nervioso central (Dubey *et al.*, 2006). En este órgano el protozooario se localiza principalmente alrededor de los vasos sanguíneos y en fetos muy jóvenes (primer tercio de gestación) la multiplicación descontrolada de los taquizoitos, tanto en cerebro como en corazón, puede causar lesiones letales (Dubey y Schares, 2006) tales como necrosis y muerte celular (Dubey y Lindsay, 1996). Otras lesiones características son encefalomiелitis, miocarditis, hepatitis, encefalitis, meningoencefalitis, epicarditis, placentitis y miositis (Nam *et al.*, 2011).

A nivel microscópico, las lesiones nerviosas incluyen encefalomiелitis no supurativa, gliosis y necrosis; los quistes tisulares usualmente se logran observar. Las lesiones miocárdicas pueden ser severas, pero suelen estar enmascaradas por autólisis (Dubey y Lindsay, 1996). Asociada a éstas lesiones se puede llegar a encontrar meningitis. Los fetos abortados cuentan con necrosis multifocal y una diseminación de infiltrados de células mononucleares en varios tejidos (Dubey *et al.*, 2006). También se puede observar inflamación linfocítica en tejidos tales como corazón, pulmón, hígado y músculo esquelético (Wouda *et al.*, 1997).

Los fetos de edad más avanzada, son capaces de responder mejor ante infecciones, por lo que la multiplicación parasitaria se produce de forma más restringida (Dubey *et al.*, 2006), en éstos casos las lesiones están presentes en menor grado y sin inflamación (Gibney *et al.*, 2008 citado por Monney y Hemphill, 2014). Aquellos terneros que nacen con signos clínicos de la enfermedad, la principal lesión característica es la encefalomiелitis (Dubey y Lindsay, 1996).

8. DIAGNÓSTICO

A la hora de realizar un diagnóstico de neosporosis bovina, no sólo es importante tener en cuenta el resultado de la prueba diagnóstica, sino que también es imprescindible la historia clínica y la epidemiología del animal o rodeo (Ortega-Mora *et al.*, 2006).

Las pruebas diagnósticas disponibles para *N. caninum* son fundamentalmente de dos tipos, las directas que detectan la presencia del protozooario en diversos tejidos o sangre y las de tipo indirecto, o también llamadas serológicas, que detectan la presencia de anticuerpos en suero, plasma o leche, éstas últimas son las más utilizadas en bovinos vivos (Álvarez-García *et al.*, 2013).

8.1. Métodos directos

- *Inmunohistoquímica*

La inmunohistoquímica es un método muy efectivo para identificar el parásito (taquizoitos o bradizoitos) en tejidos fetales. La muestra a remitir siempre es el cerebro por preferencia, pero también se lo puede identificar de forma secundaria en pulmón, riñón o músculo esquelético (Anderson *et al.*, 2000). De todas maneras, si bien esta técnica es la de elección a la hora de evidenciar el parásito en las lesiones fetales, la sensibilidad es considerada baja (Dubey, 2003). Hoy en día a nivel comercial están disponibles tanto anticuerpos monoclonales como policlonales para la realización de la prueba (Dubey y Schares, 2006).

- *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

El diagnóstico mediante técnicas moleculares tiene la ventaja de ser altamente específicos y sensibles, teniendo la capacidad de amplificar pequeñas cantidades del patógeno en muestras de gran tamaño (Anderson *et al.*, 2000) y de cuantificar el protozoario en la muestra utilizada (Dubey y Schares, 2006). Por el otro lado, las desventajas más importantes son los costos que implica, la necesidad de contar con un equipo especializado, la experiencia y entrenamiento que se necesita por parte del profesional y por sobre todo la baja eficiencia que tiene esta técnica en muestras con cierto grado de autólisis, como es el caso de muchos de los fetos remitidos para el diagnóstico de aborto (Anderson *et al.*, 2000). La eficiencia en el diagnóstico por medio de esta técnica se ve influenciada por una gran variedad de factores: el grado de autólisis, la distribución del parásito dentro de las muestras, la utilización de primers adecuados, el método de extracción de ADN, los ciclos del PCR y la formas de analizar los resultados (Dubey y Schares, 2006; Nam *et al.*, 2011).

El cerebro y los tejidos corporales del feto abortado son las muestras que se utilizan con mayor frecuencia (Nam *et al.*, 2011), pero también se lo utiliza en placenta, leche, líquido amniótico, materia fecal de perros y en muestras extraídas del medio ambiente como ser comida y agua (Dubey y Schares, 2006). En trabajos experimentales se utilizó la fracción celular del semen para la detección de ADN del protozoario, pero siempre se lo detectó a bajas cargas (Ortega-Mora *et al.*, 2006).

Por medio de esta técnica, se ha logrado diferenciar distintas cepas de *N. caninum* a través del multiplex PCR (Al-Qaassab *et al.*, 2010 citado por Nam *et al.*, 2011). Los genes que se utilizan para detectar al parásito son ADNr 18S, ADNr 28S, ITS1 y el gen pNc5 (Pena *et al.*, 2007 citado por Nam *et al.*, 2011).

- *Cultivo celular*

Se ha realizado el aislamiento de taquizoitos de *N. caninum* a través de cultivo celular, pero esta técnica no siempre es exitosa, dado que la autólisis fetal lleva a la muerte del protozoario (Dubey y Schares, 2006), para éstos casos el material a remitir de elección es el cerebro (Nam *et al.*, 2011). Es más probable aislar bradizoitos de *N. caninum* en tejido nervioso de vacas congénitamente infectadas, dado que éstos son más resistentes que los taquizoitos (Dubey y Lindsay, 1996).

8.2. Métodos indirectos

La detección de anticuerpos tanto en suero como en leche ha sido descripta

como una opción fácil, rápida y eficaz para el diagnóstico de neosporosis bovina tanto a nivel individual como grupal, siendo una herramienta ampliamente utilizada para el monitoreo en el rodeo (Almería y López-Gatius, 2013).

La detección de anticuerpos específicos que se producen en respuesta a la exposición de *N. caninum* son representados por las IgM, las cuales son las primeras en producirse, el pico se da a las 2 semanas y comienza a disminuir a las 4 semanas postinfección. Esta disminución de las IgM es seguida por la producción de IgG, las cuales permanecen por un período de 3 a 6 meses, persistiendo de por vida en los animales persistentemente infectados (Dubey y Schares, 2006). La subclase de anticuerpos detectado puede variar con el estatus clínico del animal. La IgG2 domina en casi todos los bovinos que sufrieron aborto, mientras que en bovinos infectados que no sufrieron aborto puede dominar la IgG1 o la IgG2 (Almería *et al.*, 2009 citado por Dubey y Schares, 2011). Es importante tener en cuenta que en algunos casos los títulos de anticuerpos específicos para taquizoitos disminuyen por debajo del nivel de detección, por lo que puede pasar que un animal seropositivo de un resultado seronegativo (Benavides *et al.*, 2012 citado por Guido *et al.*, 2016).

Hay varios test que pueden ser usados para la detección de anticuerpos, los más empleados son ELISA, inmunofluorescencia indirecta (IFAT) y el test de aglutinación. Algunos de éstos test están disponibles de forma comercial (Dubey, 1999; Dubey, 2003), pero es esencial que los laboratorios establezcan correctamente el título de corte para cada test. Éstos se validan usualmente mediante la comparación entre los títulos de una vaca abortada y no abortada o con el test de referencia para el diagnóstico, IFAT. Lo más recomendado, sería que la comparación se realizara con aquellas vacas en las que se diagnosticó la enfermedad por medio de la detección de *N. caninum* en sus fetos abortados o las que presentan infección congénita (Anderson *et al.*, 2000).

- *Inmunofluorescencia indirecta (IFAT)*

Esta es la prueba considerada como referente a la hora de realizar un diagnóstico serológico de *N. caninum* (Björkman y Uggla, 1999). Como antígeno se utilizan taquizoitos, por lo que el test detecta anticuerpos que se adhieren a antígenos presentes en la superficie celular del parásito. Éstos antígenos en el caso de los Apicomplexa son más específicos que los intracelulares (Björkman y Uggla, 1999). Un resultado es considerado positivo cuando se observa la membrana del taquizoito intacta (Paré *et al.*, 1995 citado por Ortega-Mora *et al.*, 2006).

Si bien tiene la ventaja de que no presenta reacción cruzada con *Toxoplasma gondii* (Dubey y Lindsay, 1996), tiene la desventaja que requiere de personal entrenado y con experiencia, siendo la observación subjetiva (Ortega-Mora *et al.*, 2006).

- *Enzima inmunoensayo (ELISA)*

Los test de ELISA disponibles pueden ser de tipo indirecto como de competición, teniendo como ventaja que es una técnica sencilla, objetiva y automatizada (Ortega-Mora *et al.*, 2006). Es la técnica de elección para

implementar a nivel de rodeo (Almería y López-Gatius, 2013), cuando las muestras son muchas (Guido *et al.*, 2016) y se necesita un resultado de forma rápida, dado que una gran cantidad de muestras pueden ser procesadas en un mismo momento (Nam *et al.*, 2011). A nivel mundial están disponibles gran variedad de kits comerciales, que pueden ser usados tanto en suero, plasma o leche (Almería y López-Gatius, 2013). Éstos kits utilizan a los taquizoitos como antígeno (Dubey y Schares, 2006; Álvarez-García *et al.*, 2013; Guido *et al.*, 2016), pudiendo utilizarlos enteros fijados, como proteínas recombinantes o como taquizoitos “iscom” (Nam *et al.*, 2011). Álvarez-García *et al.* (2003) realizaron un estudio con un panel de 458 bovinos tanto infectados (de forma natural como artificial) como no infectados para comparar y estimar la sensibilidad y especificidad de 10 ELISA comerciales. La mayoría de los kits comerciales tuvieron alta sensibilidad como especificidad (>95%), dándole una gran validez a los ELISA disponibles comercialmente y confianza a investigadores que realizan estudios epidemiológicos basándose en éstas pruebas diagnósticas.

Se han desarrollado ELISA que diferencian la presencia de IgG de la IgM, lo cual, en base a los que se mencionó anteriormente, permitiría diferenciar una infección aguda de la crónica (Dubey y Schares, 2006). Esta herramienta es de vital importancia a la hora de implementar medidas de control contra la enfermedad, dado que ayuda a determinar la vía predominante de infección, siendo diferentes las medidas prioritarias si esta es vertical u horizontal (véase Prevención y control) (Aguado-Martínez *et al.*, 2008).

Del mismo modo, Aguado-Martínez *et al.* (2008) describió un test de ELISA basado en las proteínas recombinantes NcGRA7 y NsSAG4, con el objetivo de lograr diferenciar primo-infección, re-infección, recrudecimiento e infección crónica. La proteína NcGRA7 se encuentra presente tanto en los taquizoitos como bradizoitos, siendo indicativo de infección aguda (primo-infección, reinfección o recrudecimiento), mientras que la proteína NsSAG4 está presente sólo en los bradizoitos, indicando infección crónica. La detección de anticuerpos para las dos proteínas recombinantes indicaría una reactivación de la infección o un patrón de aborto del tipo endémico. Por el contrario, en el caso de los abortos epidémicos, se detectarían anticuerpos sólo para las proteínas NcGRA7, pudiendo estar los anticuerpos contra las proteínas NsSAG4 en valores negativos o en torno al punto de corte (Aguado Martínez *et al.*, 2008).

- *Test de aglutinación directa (DAT)*

Es altamente sensible y específico, fácil de usar en varias muestras a la vez, sin requerir equipos especiales. Se puede usar para cualquier especie animal sin ningún tipo de modificación (Nam *et al.*, 2011).

- *Immunoblot (Western blot)*

Es un test muy específico, que se puede utilizar para diferenciar las etapas de infección, dado que reconoce diferentes proteínas antigénicas de *N. caninum* mediante IgA, IgE, IgG y IgM (Nam *et al.*, 2011). A la vez un immunoblot de avidéz puede utilizarse para diferenciar una infección aguda de una crónica (Aguado Martínez *et al.*, 2005). Anderson *et al.* (2007) determinaron que este test era más eficiente cuando la muestra de sangre

estaba degradada (Nam *et al.*, 2011). Usualmente se utiliza para el diagnóstico de aborto a través de fluidos fetales, siendo más específica que la IFAT (Sondgen *et al.*, 2001).

- *Test de inmunocromatografía rápida*

Es una técnica simple, rápida, sensible y específica para la detección de Anticuerpos específicos de *N. caninum* en bovinos (Nam *et al.*, 2011).

8.3. Diagnóstico de aborto

El determinar a *N. caninum* como la causa de aborto en bovinos es difícil, no sólo por la existencia de otros patógenos involucrados, sino que también los predios lecheros usualmente tienen una alta prevalencia de neosporosis (Dubey y Schares, 2006), siendo las tasas de transmisión vertical muy elevadas y se transmite en general de forma asintomática en bovinos (Dubey *et al.*, 2007). Encontrar la presencia del parásito, su ADN o incluso anticuerpos no significa que *N. caninum* haya sido la causa de aborto (Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011; Almería y López-Gatius, 2013), es indispensable tener en cuenta la epidemiología para llegar a un diagnóstico definitivo (Anderson *et al.*, 2000; Almería y López-Gatius, 2013; Guido *et al.*, 2016).

El examen de los fetos abortados es necesario para llegar al diagnóstico definitivo de neosporosis (Dubey, 2003). Lo ideal es que se remita el suero de la madre (Dubey y Lindsay, 1996), la placenta (Ortega-Mora *et al.*, 2006) y la totalidad del feto abortado (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 1999; Dubey, 2003), pero si esto no es posible se debe examinar el cerebro, corazón e hígado, de forma de poder buscar cambios histopatológicos que confirmen el diagnóstico, usualmente el órgano más afectado es el cerebro (Dubey, 1999; Dubey, 2003). Si bien el suero o líquidos corporales de los fetos abortados son los más utilizados para el diagnóstico, el líquido peritoneal debería ser el de elección a remitir (Dubey, 2003).

Para el caso de los fetos abortados, el diagnóstico de laboratorio se basa principalmente en la detección de lesiones histológicas o del patógeno en si a través de PCR (Ortega-Mora *et al.*, 2006) o inmunohistoquímica en cerebro (órgano de elección), corazón o hígado (Jenkins *et al.*, 2002; Almería y López-Gatius, 2013). En el caso que se encuentren lesiones en SNC tales que hayan podido causar la muerte fetal y en esas lesiones se encuentre el protozoario podría llegar a considerarse diagnóstico definitivo (Dubey y Schares, 2006).

- *Histopatología*

Como bien se mencionó, el diagnóstico presuntivo usualmente se puede realizar por medio de la observación de las lesiones histológicas (Anderson *et al.*, 2000). Si bien no hay lesiones patognomónicas en esta enfermedad (Dubey, 1999), las lesiones más características son encefalitis y miocarditis multifocal, caracterizada por necrosis e inflamación no supurativa (Wouda *et al.*, 1997; Dubey, 1999; Dubey, 2003; Barr *et al.*, 1991 citado por Almería y López-Gatius, 2013). Las lesiones en hígado, tales como hepatitis, son más frecuentes de encontrar en los casos de abortos epidémicos (Dubey, 1999; Dubey, 2003).

Éstas áreas focales de necrosis rodeadas por células inflamatorias también se pueden observar en medula espinal, pulmones, corazón, hígado, riñón, músculos y otros tejidos (Anderson *et al.*, 1994 citado por Anderson *et al.*, 2000; Lindsay *et al.*, 1993 citado por Jenkins *et al.*, 2002) como por ejemplo la placenta maternal (Barr *et al.*, 1991 citado por Almería y López-Gatius, 2013). Aunque este último tejido usualmente no se logra remitir al laboratorio, se han encontrado lesiones tales como placentitis y necrosis no supurativa, lo cual es indicativo de aborto temprano a causa de neosporosis (Ortega-Mora *et al.*, 2006). Los fetos abortados generalmente se presentan con autólisis y acumulación de fluidos serosanguinolentos en las cavidades corporales (Anderson *et al.*, 2000).

En un estudio llevado a cabo en España en fetos bovinos abortados se observó que los principales órganos afectados eran cerebro, corazón, riñón, pulmón e hígado, detectándose la presencia de *N. caninum* mediante PCR. Se observó que la gravedad de las lesiones disminuía a medida que la edad fetal aumentaba, siendo más severos en el primer trimestre de gestación en comparación con el segundo y tercer trimestre. En fetos en el último tercio, *N. caninum* sólo pudo ser detectado en el cerebro, y ocasionalmente en diafragma, corazón y ganglios linfáticos, esto confirma que el daño que pueda ocasionar *N. caninum* varía según la edad fetal (Collantes-Fernandez *et al.*, 2006).

- *Inmunohistoquímica*

La inmunohistoquímica generalmente es necesaria dado que hay muy pocos protozoarios presentes en las muestras, esto junto con la autólisis que presentan los tejidos, hace muy difícil el diagnóstico por medio de la observación histológica (Dubey, 2003). Si bien se ha encontrado a *N. caninum* en fetos momificados y en tejido cerebral casi líquido (Dubey y Lindsay, 1996) es muy difícil encontrarlo en los cortes histológicos de tejidos fetales, aún cuando los fetos están en buenas condiciones de preservación. Esto usualmente se da debido a que la respuesta que dispara el parásito en la célula hospedera no sólo mata a dicha célula, sino que también a los taquizoitos presentes en los fetos abortados (Dubey y Schares, 2006).

Dado que los fetos que abortan a causa de neosporosis autolisan rápidamente, el tejido cerebral debería ser fijado en formol al 10% de forma inmediata, para poder realizar inmunohistoquímica (Dubey, 1999) y examinar las secciones de tejidos mediante la tinción con hematoxilina y eosina (Dubey, 2003). Dada la baja sensibilidad que presenta esta técnica, se puede utilizar tejido fetal (fresco, congelado, fijado en formol o embebido en parafina) para el método de PCR, siempre y cuando se optimice la extracción del ADN (van Maanen *et al.*, 2004 citado por Almería y López-Gatius, 2013).

- *Detección de anticuerpos*

La búsqueda de anticuerpos en los fluidos fetales o en el suero fetal es una herramienta complementaria muy útil a la hora de buscar un diagnóstico definitivo del aborto (Dubey, 1999; Jenkins *et al.*, 2002; Dubey, 2003). Especialmente en los fetos que vienen con un grado de autólisis tal que la búsqueda de lesiones histopatológicas resulta difícil (Dubey y Lindsay, 1996). De todas formas, así como un resultado positivo no es indicativo de

aborto, un resultado negativo no indica que *N. caninum* no haya sido el causante del aborto (Jenkins *et al.*, 2002).

Los rumiantes cuentan con una placenta sindesmocorial, esto lleva a que durante la gestación la madre no le pueda transmitir inmunoglobulinas al feto, por lo que cualquier nivel de anticuerpos detectados en el feto, son de origen fetal (Innes *et al.*, 2005). Sabiendo esto, se podría decir que la posibilidad de encontrar anticuerpos en el feto aumenta con la edad gestacional (Dubey y Lindsay, 1996), dado que recién luego de los 4 meses de gestación el feto es capaz de montar una respuesta inmune celular contra el parásito (Innes *et al.*, 2005). Barr *et al.* (1995) encontraron anticuerpos contra *N. caninum* en 37 de 74 fetos, utilizando diluciones de 1:80 con la técnica IFAT, 31 de éstos fetos tenían 6 meses o más de gestación (Dubey y Lindsay, 1996). La síntesis de anticuerpos por parte del feto depende entonces de la etapa de la gestación en la que se encuentre al momento de infectarse, pero también del nivel de infección y del tiempo que paso entre la infección y el aborto; éstos factores influyen en la sensibilidad de la serología fetal (Wouda *et al.*, 1997). La respuesta que predomina a nivel fetal es la producción de IgG1, aunque también se puede observar la presencia de IgG2 e IgM (Buxton *et al.*, 1999 citado por Dubey y Schares, 2006).

9. EPIDEMIOLOGÍA

9.1. Epidemiología del aborto

La ocurrencia de abortos en un rebaño puede darse básicamente de dos formas, lo que se denomina como un patrón de aborto endémico o como un patrón de aborto epidémico, estando directamente relacionado con la presencia de *N. caninum* en el rodeo (Anderson *et al.*, 1995; Dubey *et al.*, 2006). De forma general, en el patrón endémico, los porcentajes de aborto anual no superan el 5%, pero se mantienen constantes con el correr de los años. Esto se observa principalmente en los establecimientos en los que la neosporosis está ya presente (Anderson *et al.*, 1995) y la ruta predominante de infección es la vertical. El patrón epidémico, se desarrolla básicamente en los rodeos en los que el ganado estaba libre de la enfermedad e ingresa *N. caninum* por primera vez mediante transmisión horizontal (Dubey *et al.*, 2006), observándose lo que se conoce como “tormenta de aborto”. Este último patrón es el menos frecuente, pero causa pérdidas por aborto que van desde un 10 hasta un 57% en algunos casos (Dubey y Schares, 2006), ocurriendo en un período de tiempo muy breve que puede ir de 6 (Anderson *et al.*, 1995) a 12 semanas (Davison *et al.*, 1999 citado por Goodswen *et al.*, 2013). Como concepto general, Dubey y Schares (2011) definieron como brote de aborto epidémico si más del 10 a 12,5% de las vacas con riesgo de aborto abortan en un período de entre 6 y 8 semanas.

Como se mencionó, en los abortos de tipo endémicos, la ruta predominante de infección que se da en el rodeo es la vertical. Para que esto ocurra, debe haber una inmunosupresión tal que cause en la vaca preñada una reactivación de la infección, de manera que los bradizoitos pasen a la fase de taquizoitos y se transmitan al feto (Goodswen *et al.*, 2013). Generalmente, la infección crónica no afecta el período temprano de gestación, pero si tiene un efecto abortivo luego de pasados los 90 días de preñez (Lopez-Gatius *et al.*, 2004). Se ha reportado que la ocurrencia de

aborto es mayor en gestaciones menores a seis meses, dado que pasado ese tiempo el ternero tiene un grado de desarrollo tal que puede combatir de mejor manera la infección; resultando de un ternero clínicamente sano, pero persistentemente infectado (Guy *et al.*, 2001).

Los patrones de aborto reportados como epidémicos están relacionados con infecciones primarias de vacas que nunca han sido expuestas al protozoario, este tipo de infección generalmente proviene de una única fuente de infección, siendo las vacas expuestas casi al mismo tiempo (McAllister *et al.*, 2000) mediante la ingestión de ooquistes (Anderson *et al.*, 2000). La concentración de anticuerpos contra *N. caninum* aumenta durante el brote y disminuye luego del día 85 post exposición (McAllister *et al.*, 2000); en general las vacas recientemente infectadas tienen bajos títulos de anticuerpos y se observará en muchas la seroconversión al momento del brote, lo que sugiere la existencia de transmisión horizontal (Dubey, 2003).

Es importante tener en cuenta que cuando las tormentas de aborto están asociadas a infecciones postnatales, niveles de transmisión vertical de madres a hijas serán más bajos (Landmann *et al.*, 2011), y la probabilidad de aborto será mayor que en vacas con infección crónica (Lopez-Gatius *et al.*, 2004; McAllister *et al.*, 2000). Es por eso que en un predio los niveles de transmisión vertical serán indicativos de la presencia de infección crónica o post natal que esté ocurriendo (Landmann *et al.*, 2011).

La probabilidad de infección al feto una vez que la vaca es infectada durante la gestación y la ocurrencia de aborto depende de varios factores: la cantidad de ooquistes ingeridos por la vaca preñada, el tiempo, la cantidad y duración de la parasitemia, la etapa de la gestación y el sistema inmunitario tanto de la madre como del feto (Innes *et al.*, 2005; Goodswen *et al.*, 2013); siendo mayor la probabilidad de infección del feto cuando se ingieren gran número de ooquistes y en etapas más tardías de la gestación (Gondim *et al.*, 2004c). La edad del animal gestante no parece ser un factor que influya en la probabilidad de infección, por lo menos por medio de la vía horizontal (Anderson *et al.*, 2000). Por otro lado, hay reportes que indican que la transmisión vertical es más usual en las vacas preñadas de menor edad (Dubey, 2003). En cuanto al riesgo de infección fetal, se ha descrito que este aumenta junto con el aumento de la edad gestacional (Innes *et al.*, 2005).

Previo a hablar de vacas con riesgo de aborto y sus factores asociados, es importante definir qué animales son los que están en riesgo. La “vaca en riesgo” varía si se trata de un caso de aborto endémico o epidémico. Para el caso de abortos endémicos, se considera como vaca en riesgo todas aquellas vacas que hayan estado preñadas desde que comenzaron los sucesos de aborto, puede tratarse de meses o incluso años. Para el caso de los abortos epidémicos, las vacas en riesgo son aquellas que presentaban preñeces de entre 58 a 260 días cuando comenzó el brote (Schaes *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que vacas seropositivas a *N. caninum* tienen mayor riesgo de aborto que las seronegativas (Dubey, 1999; Dubey *et al.*, 2003; Williams *et al.*, 2009), y este riesgo aumenta con el aumento del título de anticuerpos (Dubey *et al.*, 2007). Kashiwasaki *et al.* (2004) observaron que

vacas con altos títulos de Ac (IFAT=1:3200) tenían un riesgo de aborto mayor (OR=10) que aquellas seropositivas, pero con bajos títulos de Ac (IFAT=1:200). A nivel predial se ha visto que altas prevalencias están asociadas con un aumento en el riesgo de aborto en el predio, esto se explica por el aumento del riesgo de aborto en las vacas con infección crónica sumado al riesgo de infección postnatal que se incrementa a causa de la primera (Dubey *et al.*, 2007). Pabón *et al.* (2007) realizaron el seguimiento durante tres años a un predio seropositivo a *N. caninum*, este tenía un 13% de abortos de los cuales más del 90% de esas vacas eran seropositivas y de esos abortos el 61,5% se trataban de repetición de abortos. Éstos autores reportaron que en vacas con infección crónica la tasa de aborto fue casi igual a la tasa de repetición de aborto, siendo frecuente que las vacas que abortaran una vez lo sigan haciendo. Por otro lado, en un estudio que fue llevado a cabo en California, se determinó que los bovinos con infección congénita tenían 7,4 más riesgo de aborto en la primera preñez que aquellos bovinos no infectados. A la vez, los bovinos seropositivos que abortaban, tenían 5,7 más de riesgo de volver a abortar en la gestación siguiente (Thurmond y Hietela, 1997). De todos modos, si bien éstos datos parecerían indicar que la mejor opción para controlar los abortos es disminuir la prevalencia intra-predial, se ha observado que el riesgo de un brote de aborto epidémico se incrementa cuando esto ocurre, ya que vacas con infección crónica desarrollan cierta inmunidad contra posteriores infecciones exógenas (McAllister *et al.*, 2000).

Cuando se va a proceder a analizar un predio, es importante calcular el OR del riesgo de aborto, dado que nos puede llegar a dar información útil sobre el patrón de aborto. En algunas ocasiones OR menores a 10 podrían indicar que el patrón de aborto es endémico, mientras que OR superiores que es epidémico (Schaes *et al.*, 2002 citado por Dubey *et al.*, 2007).

9.2. Prevalencia

Múltiples trabajos se han realizado sobre la prevalencia de *N. caninum* alrededor del mundo, de tal forma que este protozooario ha sido detectado en cada país en el que fue llevado a cabo un estudio epidemiológico (Goodswen *et al.*, 2013).

Si se evalúa la seroprevalencia de la enfermedad en distintas partes del mundo, se puede observar que se han encontrado considerables diferencias entre países, dentro de cada país, entre regiones e incluso entre el ganado lechero y carnívoros (Dubey y Schaes, 2011). Éstas seroprevalencias varían dependiendo del test utilizado para el diagnóstico (Dubey, 2003; Almería, 2013), el título de corte (Dubey, 2003), el diseño de muestreo y, para el caso de los biotipos, las diferencias marcadas pueden deberse también al manejo realizado en los distintos sistemas (Moore *et al.*, 2009). Es por eso que en esta revisión se procederá a describir la distribución geográfica de *N. caninum*, sin hacer grandes comparaciones entre estudios.

En el año 2006 en Europa se llevó a cabo un estudio en el que se determinaron las prevalencias prediales de *N. caninum* en Alemania, Países bajos, España y Suecia, las cuales para el rodeo lechero fueron de 49, 76, 63 y 16%, respectivamente. Como se observa hubo grandes diferencias entre los países estudiados, a pesar que el método de muestreo y la técnica

de ELISA implementada fue la misma (Bartels *et al.*, 2006). Un factor importante a tener en cuenta es la presencia en cada región de posibles factores de riesgo o de protección asociados a esta enfermedad que contribuyen a la variación en las seroprevalencias (Goodswen *et al.*, 2013).

La seroprevalencia de *N. caninum* en un predio o región puede ser muy constante con el correr del tiempo. Más aún en aquellos lugares en los que no se implementan medidas para su control (Pabón *et al.*, 2007) y la transmisión horizontal no es muy frecuente (Monney y Hemphill, 2014). Esto se reportó en un estudio llevado a cabo en España, en el que se realizó el seguimiento a un predio lechero durante tres años consecutivos, muestreándose 259, 222 y 231 bovinos en cada año, de los cuales 122 animales fueron los mismos en cada muestreo, de éstos últimos bovinos mencionados, en los tres años de estudio sólo seroconvirtieron 4 (3,3%) (Pabón *et al.*, 2007).

A la vez, la seroprevalencia en los predios varía significativamente según éstos tengan o no historias de brotes de aborto (Canada *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2005; Reiterová *et al.*, 2009). Canada *et al.* (2004) evaluaron en una zona de producción intensiva de leche en Portugal dos grupos de predios, uno seleccionado de forma aleatoria en la zona (49 predios, 114 vacas) y el segundo seleccionado por ocurrencia de historia de aborto ya sea de forma endémico o epidémica (36 predios, 1237 vacas); observándose diferencias significativas en las seroprevalencias de cada grupo (28 vs. 46%, respectivamente) (Canada *et al.*, 2004). Un estudio similar se realizó en México, en donde el grupo con historia de aborto tenía una seroprevalencia del 72%, mientras que el grupo que tenía tasas de aborto consideradas como normales para la zona tenía seroprevalencias del 36% (Morales *et al.*, 2001). Moore *et al.* (2002) realizaron un trabajo en la pampa húmeda en Argentina con 2414 vacas tanto carniceras como lecheras, se estimaron las seroprevalencias por medio de la técnica IFAT, observándose que para el caso de las vacas lecheras el 16,6% (174/1048) de vacas sin antecedentes de enfermedades reproductivas eran seropositivas, mientras que el 43,1% (323/750) de vacas con historia de abortos se encontraron eran seropositivas. De todas maneras, se debe tener en cuenta que la historia de aborto no debería ser un factor que afectara la seroprevalencia de *N. caninum*, sino que más bien es un factor que ocurre a causa de la enfermedad.

Como se mencionó anteriormente, es una enfermedad que se ha reportado en la mayor parte del mundo, incluyendo: Australia, Nueva Zelanda, Europa, Corea, Japón, Tailandia y en todo el continente americano (Dubey, 2003). En Francia (Orne) se realizó un muestreo aleatorio en el que se seleccionaron 42 predios lecheros y un total de 1924 vacas y vaquillonas (mayores a 15 meses de edad); a diferencia de otros estudios realizados en Europa y en el mundo, la seroprevalencia resultó ser baja (5,6%), al igual que la prevalencia predial e intrapredial, que fueron del 66,7% y 1,1 – 8%, respectivamente, si bien este estudio data ya de casi 20 años atrás, la sensibilidad y especificidad del kit comercial de ELISA era alta (98%) y los autores tomaron dos muestras de los mismos animales para evitar falsos negativos, considerándose a un animal como positivo cuando tenía al menos un resultado a la prueba positivo, lo que lleva a suponer que los niveles de

infección en esa zona realmente eran bajos (Ould-Amrouche *et al.*, 1999). Más recientemente en Turquía, fue llevado a cabo un estudio serológico en 560 bovinos a través de un kit de ELISA comercial, siendo el 39,6% de las muestras positivas (Ekici *et al.*, 2018).

También en África ha sido descrita, en Etiopía se muestrearon 2334 bovinos perteneciente a 273 tambos, siendo la prevalencia individual del 13,3% y la predial del 39,6%, no observándose diferencias significativas entre los predios de menor y mayor tamaño, ni entre los cercanos y lejanos a zonas urbanas (Asmare *et al.*, 2013). Por otro lado, en el sur de Egipto se estudió la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en un total de 301 bovinos, reportándose que la seroprevalencia en esa región fue del 18,9% (Fereig *et al.*, 2016).

Infecciones por *N. caninum* han sido reportados en gran parte de América del Sur, en Argentina, Brasil, Chile, Paraguay, Perú, Uruguay (Moore, 2005), Colombia (Pulido *et al.*, 2016) y Venezuela (Lista-Alves *et al.*, 2006). Habiendo evidencia de exposición no sólo en bovinos, sino que también en ovinos, cabras, perros, gatos, búfalos de agua, alpacas, llamas, zarigüeyas sudamericanas, lobos y otros canidos silvestres (Moore, 2005).

En Brasil, se han realizado numerosos estudios en diferentes regiones. Por ejemplo, en Bahía se realizó una investigación en 447 bovinos lecheros (14 predios), determinándose por medio de la técnica IFAT que el 14% de los animales eran seropositivos a *N. caninum* (Gondim *et al.*, 1999). Por otro lado, en Paraná se realizaron dos trabajos, uno en el año 2004 (Guimaraes *et al.*, 2004) y otro en el 2005 (Ogawa *et al.*, 2005). En el primero se utilizaron 623 vacas adultas perteneciente a 23 tambos, determinándose por medio de IFAT que la seroprevalencia en la región era del 14,3% (Guimaraes *et al.*, 2004); mientras que en el segundo la seroprevalencia reportada fue del 12 % también por medio de IFAT, muestreándose 90 predios lecheros y un total de 385 bovinos (Ogawa *et al.*, 2005). En el año 2006 Corbellini *et al.* (2006) realizaron un estudio epidemiológico en 60 predios lecheros, siendo seleccionados de forma aleatoria en 2 regiones del sur de Brasil, en dicho estudio se mostró el 40% de los animales de cada predio, resultando en 1549 animales que se diagnosticaron por medio de la prueba IFAT. La seroprevalencia a nivel individual determinada en este estudio fue de 17,8%, mientras que la encontrada a nivel predial fue 93,3%.

En Paraguay, la seroprevalencia estimada por medio de ELISA fue de 29,8% en 879 bovinos tanto de carne como de leche (Osawa *et al.*, 2002). Mientras que en Colombia se determinaron seroprevalencias de 64% en un hato lechero en el municipio de Toca y de 76,9% en el municipio de Pasto (Cedeño y Benavides, 2013).

En la zona central de Chile, Hervé-Claude *et al.* (2017) realizaron un estudio de seroprevalencia en 11 tambos lecheros pequeños, en donde se muestrearon 47 bovinos en total. Su seroprevalencia estimada a nivel individual fue del 55% mientras que la predial del 67% (Hervé-Claude *et al.*, 2017). En Venezuela, la primera evidencia de exposición a *N. caninum* en predios bovinos fue reportada en el año 2006, en donde se muestrearon 459 bovinos de doble propósito provenientes de 15 predios; la seroprevalencia en este estudio resulto ser de 86,7% (Lista-Alves *et al.*, 2006).

En cuanto a los reportes encontrados en el Uruguay, el primer registro de infección fue determinado en 414 perros de estancia por Barber *et al.* (1997), en los cuales se encontró serología positiva por medio de IFAT en el 20% de éstos animales. Posteriormente, Cobo *et al.* (1999) detectaron a *N. caninum* en un brote de abortos en vacas Holando del departamento de Florida, éstas vacas fueron seropositivas mediante la técnica IFAT, y a los fetos abortados se les realizó inmunohistopatología la que resulto compatible con *N. caninum*. Un trabajo realizado por Easton *et al.* (2003) en el que se describió la etiología de abortos en fetos que llegaron a la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE) entre el año 1996 a 2002 establecieron que *N. caninum* era una de las principales causas de aborto (22%).

El primer reporte de seroprevalencia en ganado lechero realizado en el Uruguay fue en el año 2003 por Piaggio (2006). Este estudio se realizó en 1597 bovinos provenientes de 49 predios lecheros de los departamentos de Colonia, Florida y San José (lo que se considera como la principal cuenca lechera sur del país). Para la selección de la muestra se realizó un muestreo aleatorio estratificado bietápico, en el que se seleccionó primero los establecimientos, quedando excluidos del muestreo todos los que tuvieran 30 vacas de ordeño o menos, y luego de cada establecimiento se tomaron muestras en forma sistemática de 20 bovinos, de los cuales 10 eran vacas adultas y 10 vaquillonas. La seroprevalencia reportada por medio del ELISA indirecto a nivel individual fue del 22%, mientras que la predial resulto ser de 92%; la mayor parte de los predios contaron con una seroprevalencia intra rodeo de 10 a 30% (Piaggio, 2006).

Para el caso del ganado de carne, Bañales *et al.* (2006) realizaron un estudio transversal de 4444 bovinos, correspondientes a un total de 229 establecimientos distribuidos por todo el territorio uruguayo (a excepción de Montevideo). En este estudio se estimó que la seroprevalencia individual fue del 13,9%, y la predial de 69,2%. No se observaron diferencias significativas entre las prevalencias de vacas (14,3%) y vaquillonas (12,9%), pudiendo estar relacionado con la mayor importancia que tiene la transmisión vertical en éstas explotaciones (Bañales *et al.*, 2006).

9.3. Factores de riesgo

A lo largo de los años se han llevado a cabo múltiples estudios epidemiológicos que evalúan el riesgo, tanto a nivel individual como predial, de sufrir infección con *N. caninum* (riesgo de infección) o de sufrir aborto a causa del protozooario (riesgo de aborto). Se cree que ambos riesgos están asociados de forma positiva, pero influyen de diferente manera (Dubey *et al.*, 2007).

A continuación, se describirán los factores de riesgo que han sido reportados en la bibliografía, de forma de entender mejor la epidemiología de la enfermedad.

- *Presencia del hospedero definitivo (perro)*

La presencia de perros dentro de un predio se lo ha visto asociado a un aumento de la prevalencia en el ganado bovino en muchas investigaciones realizadas sobre el tema (Corbellini *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007; Schares *et al.*, 2004; VanLeeuwen *et al.*, 2010), habiendo una clara relación entre la

prevalencia de *N. caninum* en perros y bovinos dentro del predio (Dubey, 1999). Este hallazgo tiene sentido, dado que la presencia de los perros aumenta el riesgo de transmisión horizontal, ya que como se describió anteriormente, éstos son los que liberan los ooquistes capaces de infectar a los bovinos (Dubey y Schares, 2011).

En un estudio llevado a cabo en el estado de Santa Catarina, Brasil se observó que los predios que contaban con perros eran 2,22 veces más probables de infectarse que aquellos que no contaban con este hospedero definitivo (Fávero *et al.*, 2017). Por otro lado, Guimaraes *et al.* (2004) en Paraná, Brasil también encontraron una asociación entre presencia de perros en el predio y presencia de *N. caninum* en el ganado, pero esta se la consideró baja; los autores lo atribuyeron a la no inclusión en el estudio de los perros callejeros y salvajes. De forma similar, Wouda *et al.* (1999b) describieron que aquellos predios sin perros tenían una seroprevalencia significativamente menor que aquellos que si contaban con perros.

Los hábitos de alimentación de los perros son muy importantes, y definitivamente contribuyen a aumentar el riesgo de infección, dado que este aumenta cuando los perros consumen placentas y/o fetos abortados (VanLeeuwen *et al.*, 2010). En un estudio realizado en la zona central de Chile se observó que aquellos predios en que los perros consumían alimentos caseros y no los de origen comercial, tenían mayor probabilidad de ser positivos a *N. caninum* (OR=6) (Hervé-Claude *et al.*, 2017). A la vez, la seropositividad a *N. caninum* está asociado a los potreros y no tanto al origen de la fuente de alimento; esto significa que el riesgo de contaminación con ooquistes en el alimento es mayor una vez que se lo distribuye (Dubey *et al.*, 2007).

El número de hospederos definitivos en contacto con el agua y alimento de los bovinos también se ha visto que incrementa el riesgo de infección (Corbellini *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007; Monney y Hemphill, 2014). En un estudio realizado en Alemania por Schares *et al.* (2004) se determinó que un buen predictor de prevalencia en la leche de tanque positiva a *N. caninum* era el número de perros presentes, así como también el distrito, ciudad o municipalidad en la que se ubicaba el tambo.

Hobson *et al.* (2005) determinaron que por cada perro adicional que hubiera en el predio, el riesgo de aborto por *N. caninum* aumentaba 2,8 veces. Otros autores describieron que la presencia de perros en un predio afecta la seroprevalencia en ganado bovino cuando hay más de dos (Otranto *et al.*, 2003) o tres (Portocarrero *et al.*, 2015) perros según los trabajos. De forma similar, en un estudio realizado en el sur de Brasil se reportó que por cada perro adicional que hubiera en el predio lechero, la probabilidad de infección de las vacas aumentaba 1,13 veces (Corbellini *et al.*, 2006).

No sólo la presencia o número de perros es considerado un posible factor de riesgo para esta enfermedad, sino que el tiempo que llevan los perros en el predio también es relevante, y aquí es donde la bibliografía difiere. Hay autores que afirman que la presencia de perros por más de 5 años (Asmare *et al.*, 2013) o incluso por más de 10 años llevan a aumentos en la seropositividad del ganado lechero (Dubey *et al.*, 2007); mientras que otros afirman que el riesgo de infección aumenta en predios con perros

recientemente introducidos en comparación con perros residentes. Esto puede estar relacionado a que perros más jóvenes liberan mayor cantidad de ooquistes (Dijkstra *et al.*, 2002 citado por Dubey *et al.*, 2007).

Pero no todas las investigaciones realizadas encontraron los mismos resultados. En dos estudios realizados por Romero *et al.* (2002, 2017) en Brasil la presencia de perros no se la vio asociada a la presencia de la enfermedad en los bovinos. Éstos autores atribuyeron la falta de asociación a que seguramente el número de perros reportado por los productores fuera inferior al que las vacas estuvieran realmente expuestas, a la vez, hubo un muy alto porcentaje de predios con perros, que seguramente circulan entre predios. Lo mismo sucedió con el trabajo realizado por Piaggio (2006) en Uruguay dando argumentos similares a los previamente descritos, no descartando la presencia de un posible factor de confusión.

No hay grandes evidencias que la presencia de perros en el ganado de carne sea un factor de riesgo para la infección de los bovinos. Un posible argumento es que éstos tipos de sistemas son más extensivos, siendo más difícil el contacto de los bovinos con las heces de los caninos (Dubey *et al.*, 2007).

- *Presencia de otros carnívoros*

Si bien es sabido que los gatos no son hospederos definitivos de *N. caninum*, en un estudio epidemiológico realizado por Ould-Ambrouche *et al.* (1999) en ganado lechero, se observó que la presencia de felinos en el predio actuaba como un factor de protección, esto posiblemente fue un factor de confusión relacionado con la ausencia de perros en ese predio. Otra posible explicación, es que los felinos al alimentarse de hospederos intermediarios (por ejemplo: el ratón) disminuyen de cierta forma la probabilidad de que éstos infecten a los perros allí presentes (Dubey *et al.*, 2007).

- *Presencia de otros hospederos intermediarios diferentes al bovino*

Otros posibles hospederos intermediarios (véase Hospederos) pueden ser fuente de infección para los perros, observándose en múltiples estudios que la presencia de ratones, patos y aves de corral actuaron como factores de riesgo en la infección de *N. caninum* (Dubey *et al.*, 2007).

- *Presencia de aves de corral*

El rol de las aves en el ciclo biológico de *N. caninum* no se conoce con certeza, de todas formas, tienen importancia biológica y en la transmisión de este protozooario, dado que se comportan como vectores mecánicos de los ooquistes y son hospederos intermediarios (Bartels *et al.*, 1999; de Barros *et al.*, 2018).

Se ha demostrado que existe una asociación positiva entre la presencia de aves en los predios con bovinos y el aumento de la seroprevalencia en dichos rumiantes, viéndose un mayor riesgo de aborto (Donahoe *et al.*, 2015). Los brotes de aborto se asociaban al aumento de la presencia de aves de corral cuando éstas eran más de 10 (Dubey *et al.*, 2007).

En un estudio llevado a cabo en 111 tambos de Italia se encontró una interacción entre la presencia de aves de corral, la presencia de perros y el

nivel de seroprevalencia en bovinos (OD=1,9), la hipótesis que los autores plantearon fue que una vez que los perros liberan ooquistes, las aves actúan como vectores mecánicos arrastrándolos a los alimentos de los bovinos (Otranto *et al.*, 2003).

- *Edad del bovino/Categorías afectadas*

Importantes trabajos se han realizado en busca de asociación entre edad de los bovinos y el nivel de seropositividad en el predio, y se han encontrado resultados discrepantes. Hay autores que encontraron tal asociación (Monney y Hemphill, 2014; Macedo *et al.*, 2017), observándose que el riesgo de seropositividad aumenta a mayor edad, tanto en ganado de carne como de leche, sugiriendo que la transmisión horizontal tiene particular importancia en algunos predios (Dubey *et al.*, 2007; Macedo *et al.*, 2017). Por ejemplo, Guimaraes *et al.* (2004) observaron que vacas de 12 a 24 meses de edad tenían seroprevalencias más bajas que las mayores a 24 meses. De forma similar, un estudio llevado a cabo en el sur de Brasil en 41 vacas lecheras abortadas se determinó que aquellas con más de 36 meses de edad tenían mayor riesgo de ser seropositivas (Macedo *et al.*, 2017).

Este factor puede estar asociado al número de partos que tienen las vacas, en un estudio llevado a cabo por Jensen *et al.* (1999) en 1561 vacas provenientes de 31 tambos se observó que tanto la seropositividad a *N. caninum* como el riesgo de aborto aumentaba con la edad, en especial cuando éstas tenían dos o más gestaciones (OR=3).

Por el contrario, en dos trabajos el riesgo de infección transplacentaria disminuía a medida que las vacas tenían mayor edad, viéndose una relación entre la probabilidad de transmitir la enfermedad y el número de partos (6 en el caso de Romero *et al.*, 2002); lo que sugiere que eventualmente las vacas adultas desarrollan cierto grado de inmunidad, previniendo la transmisión transplacentaria endógena (Romero *et al.*, 2002; Dijkstra *et al.*, 2003). En cuanto al riesgo de aborto este disminuye con el número de pariciones, incluso en el trabajo realizado por Lopez-Gatius *et al.* (2005) se lo identifica como un factor de protección (Dubey *et al.*, 2007).

De forma similar, Yildiz *et al.* (2009) reportaron que vacas de 1 a 4 años tuvieron seroprevalencias mayores que aquellas de 5 a 9 años, esto pudo deberse a que aquellas vacas de mayor edad seropositivas eran descartadas por posibles problemas de infertilidad.

De todas maneras, no en todas las investigaciones se encuentran este tipo de asociaciones, Bartels *et al.* (1999) y Moore *et al.* (2009) no encontraron asociación en el ganado de leche y carne respectivamente, sugiriendo que los niveles de infección horizontal tienden a ser relativamente bajos (Bartels *et al.*, 1999). Gindri *et al.* (2018) realizaron una investigación en Brasil con 322 bovinos en la que tampoco encontraron diferencias con la edad de los animales, éstos asumieron que esto se debió a la baja frecuencia de la transmisión horizontal presente en la zona.

Que en algunos países o regiones se observó un aumento de prevalencia con la edad y en otros lo contrario, o incluso no ocurra, puede estar asociado a las variaciones en la probabilidad de transmisión horizontal, de niveles de reemplazo y de tasa de descarte que tenga cada país o región. A modo de

ejemplo, en casos que un predio compre hembras de reemplazo a otro con menor prevalencia, sus hembras jóvenes tendrán una seroprevalencia inferior a las vacas adultas (Dubey *et al.*, 2007).

- *Tamaño del predio/Altas cargas de animales*

En el estudio realizado por Otranto *et al.* (2003) se observó que el riesgo de infección individual de los bovinos en un predio aumentaba cuando el tamaño del mismo también lo hacía, los autores lo relacionaron a que el número de perros aumentaba en predios de mayor tamaño. Del mismo modo, en Perú se llevó a cabo un estudio con 388 bovinos pertenecientes a 20 predios ganaderos, observándose que en los predios con más de 100 bovinos, el riesgo de infección aumentaba (Portocarrero *et al.*, 2015).

La probabilidad de que un predio sea positivo a *N. caninum* aumente a medida que aumenta su tamaño puede relacionarse a que éstos son más propensos a comprar hembras de reemplazo o bien a que por su tamaño, las medidas de higiene para prevenir que los perros se alimenten de material infectado sean más difíciles de aplicar (Dubey *et al.*, 2007).

Corbellini *et al.* (2006) llevaron a cabo un estudio en el sur de Brasil, reportando que a medida que el tamaño del tambo aumentaba (hectáreas) la seroprevalencia del rodeo disminuía, esto pudo deberse a que en tambos más pequeños los perros tienden a tener más fácil acceso a carcasas de bovinos, fetos abortados, placentas y descargas uterinas que en el caso de los tambos más grandes.

Para el caso de ganado de carne, se observó que altas densidades de animales se relacionaba con mayores niveles de seropositividad, dado que este tipo de explotaciones ganaderas con altas cargas suelen suplementar a los animales con grano o silos, atrayendo a hospederos intermediarios y así a los perros, favoreciendo la transmisión horizontal (Barling *et al.*, 2000a; Dubey *et al.*, 2007).

- *Fuente de hembras de reemplazo*

Se lo considera como factor de riesgo la cría de las propias vaquillonas para el reemplazo, cuando la prevalencia del predio es alta (Monney y Hemphill, 2014); esto está asociado a que la seroprevalencia de un predio tiende a disminuir cuando las hembras de reemplazo se compran a un predio con seroprevalencia más baja (Dubey *et al.*, 2007). Dándose básicamente en predios con neosporosis endémica, en los que la transmisión vertical es alta (Barling *et al.*, 2001). Por el contrario, en caso de predios libres o con seroprevalencias intraprediales bajas, el riesgo de infección aumenta cuando se compran hembras para el reemplazo, en el estudio realizado por Gindri *et al.* (2018) se determinó que la compra de hembras a otros predios jugaba un papel importante en la ocurrencia de la enfermedad (OR=2,2).

- *Presencia de otras enfermedades dentro del predio*

Si bien *N. caninum* es considerado un patógeno primario, existen enfermedades que pueden llegar a agravar la neosporosis (Dubey y Schares, 2011). En Italia se encontró una co-infección de un 27% de 948 bovinos con el herpesvirus bovino tipo I, determinándose por regresión logística que cada enfermedad es un factor de riesgo para la otra (Rinaldi *et*

al., 2007). Esto puede relacionarse a que la infección con *N. caninum* está asociada muchas veces a enfermedades inmunosupresoras, como son rinitis infecciosa bovina (IBR) (Dubey *et al.*, 2007), diarrea viral bovina (DVB) (Dubey *et al.*, 2007; Duong *et al.*, 2008; Yildiz *et al.*, 2009) y leucosis bovina enzootica (LBE) (VanLeeuwen *et al.*, 2010); con respecto a esta última por ejemplo, se reportó que vacas seropositivas a LBE eran 1,5 veces más probable de que fueran seropositivas a *N. caninum* (VanLeeuwen *et al.*, 2010).

Por el contrario, estudios realizados por Bartels *et al.* (1999) no asociaron el riesgo de aborto por *N. caninum* con IBR, DVB, *Leptospira* spp. serovar Hardjo ni *Salmonella dublin*. Mientras que Peregrine *et al.* (2006) no lo asociaron a *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, *Icterohaemorrhagiae* ni Pomona (Dubey *et al.*, 2007).

Hobson *et al.* (2005) realizaron un estudio en Ontario en el que observaron que la vacunación contra otros agentes infecciosos disminuía los niveles de estrés en el rodeo, por lo que también disminuía el riesgo de aborto por *N. caninum*.

- *Antigüedad del tambo*

Klauck *et al.* (2016) determinaron que los tambos con menos de 10 años de permanencia tenían un mayor riesgo de infección, dado por la menor experiencia en la implementación de medidas de higiene y en la actividad en general, como por ejemplo en la compra de hembras de reemplazo sin hacer diagnóstico de enfermedades reproductivas.

- *Historia de abortos*

Como ya se ha mencionado, varios trabajos han asociado la historia de aborto de las vacas con las seroprevalencia individual (Asmare *et al.*, 2013; Ansari-Lari *et al.*, 2017), determinándose que aquellas vacas con historia de aborto tienen un 85% más de probabilidad de estar infectadas con *N. caninum* (Moore *et al.*, 2009). En un estudio epidemiológico llevado a cabo en el estado de Santa Catarina, Brasil se reportó que de 130 vacas el 43,8% eran seropositivas a *N. caninum*, y aquellas vacas seropositivas tenían 3 veces más riesgo de aborto que las seronegativas (21,6% vs. 7,3% de aborto) (Klauck *et al.*, 2016). Del mismo modo, Fávero *et al.* (2017) hallaron una asociación entre la presencia de problemas reproductivos en predios y el nivel de seropositividad de éstos. Las vacas seropositivas tenían un 25% más de probabilidad de tener problemas reproductivos tales como abortos, metritis y/o mortalidad neonatal. Hall *et al.* (2005) estudiaron por un período de un año un tambo de 266 bovinos en Australia. Éstos autores no sólo determinaron que vacas seropositivas tenían 13 veces más riesgo de aborto que aquellas seronegativas, sino que el riesgo de infección era más alto (37%) cuando había co-infección con DVB. De forma similar, en Uruguay se estudiaron 217 bovinos de un predio lechero, observándose que aquellas vacas con títulos superiores a 1:3200 por medio de IFAT tenían mayor riesgo de aborto que vacas seronegativas (Kashiwasaki *et al.*, 2004).

La existencia de historias de aborto recientes, debería tomarse como una consecuencia de la presencia de animales seropositivos, y no como una causa del aumento de los niveles de infección; es un indicativo de la

existencia de un problema (Romero *et al.*, 2017). En el trabajo realizado por Martínez *et al.* (2017) se reportó que vacas seropositivas tenían 6,63 veces más de probabilidad de tener antecedentes de historia de aborto. Esto fue determinado por medio de la construcción de un modelo jerárquico en el que se tuvieron en cuenta como efecto aleatorio los predios lecheros y como efecto fijo el estatus serológico del animal, edad y ubicación del predio (Martínez *et al.*, 2017).

- *Presencia de vacas con retorno al estro luego de gestaciones confirmadas*

Este tema ha sido muy discutido a lo largo de los años, encontrándose diferencias entre autores y resultados. Por un lado, hay autores que afirman una asociación positiva entre la presencia de aborto por *N. caninum* en predios y las tasas anuales de retorno al estro luego de confirmada la gestación. Altas tasas de pérdidas de gestaciones tempranas aumentan la probabilidad de la presencia de perros circulantes, y por ende de transmisión horizontal. Por el contrario, otros estudios epidemiológicos no indicaron que *N. caninum* fuera causante de pérdidas gestacionales tempranas (Dubey *et al.*, 2007).

- *Biotipos y razas*

Existe cierta evidencia epidemiológica de que la infección con *N. caninum* varía entre el ganado de carne y leche (Almería y Lopez-Gatius, 2013), notándose un mayor riesgo de aborto en el ganado lechero vs. carnívoros (De Meerschman *et al.*, 2002 citado por Almería y Lopez-Gatius, 2013). Este concepto debe ser tomado con precaución, dado que probablemente éstas diferencias están causadas por variaciones en el manejo productivo, y no por la diferencia en susceptibilidad que presentan los biotipos (Dubey *et al.*, 2007). Moore *et al.* (2009) determinaron que vaquillonas lecheras de reemplazo tenían un 76% más de probabilidad de ser seropositivas a *N. caninum* que las de ganado de carne, sugiriendo que la exposición postnatal es más frecuente en explotaciones lecheras que en carniceras.

También se encontraron diferencias en la susceptibilidad entre razas o cruza, por ejemplo: la raza Limousine o sus cruza son menos susceptibles a la infección con *N. caninum* (Almería y Lopez-Gatius, 2013). Es por eso que se estudió que la inseminación artificial de vacas lecheras seropositivas a *N. caninum* con semen de toros carniceros, principalmente el Limousine, disminuye el riesgo de aborto, pero es variable dependiendo del título de anticuerpos de la vaca (Almería *et al.*, 2009).

- *Alimento en mal estado o con moho*

La alimentación de vacas con alimentos en mal estado se ha demostrado favorece el recrudecimiento de la enfermedad en vacas con infección crónica, dado que la ingestión de micotoxinas puede llevar a la inmunosupresión, ocasionando la reactivación de los bradizoitos a taquizoitos (Bartels *et al.*, 1999). Por el contrario, Guimaraes *et al.* (2004) observaron que alimentar a los bovinos con silos o concentrados producidos en el mismo predio actuaban como factor protector, dado que la forma de almacenamiento evitaba que los perros estuvieran en contacto con dicho alimento.

La alimentación con fardos de baja calidad (sobre todo en verano) o el suministro de réstos de fardo a vaquillonas, se los considera como un factor de riesgo para la ocurrencia de abortos epidémicos de *N. caninum*, dado que como mencionamos anteriormente, la baja calidad del alimento puede estar relacionado con la presencia de micotoxinas, y por el otro, el suministro de alimentos sobrantes a vaquillonas aumenta el riesgo de contaminación con materia fecal por parte de hospederos definitivos (Dubey *et al.*, 2007).

En ganado de carne, se reportó que colocar fardos en campos con vacas gestantes era un posible factor de riesgo, ya que éstas suelen abortar cerca de los fardos atrayendo a los perros y favoreciendo que éstos liberen los ooquistes entorno a dicho alimento. En ese mismo estudio se determinó que el uso de comederos actuaba como un factor de protección (Barling *et al.*, 2000b).

- *Presencia de agua estancada*

La presencia de agua estancada como fuente de bebida para los bovinos es considerada un factor de riesgo para la neosporosis bovina (Ould-Amrouche *et al.*, 1999). Por otro lado, Hervé-Claude *et al.* (2017) realizaron un estudio en pequeños predios lecheros en la zona central de Chile y reportaron que el consumo de agua de canales de riego favorecía la transmisión horizontal de *N. caninum* (OR=4,5, p=0,034). De forma similar, se determinó como un potencial factor de riesgo el consumo de agua de fuentes naturales (Justo *et al.*, 2013).

- *Clima y otros agentes estresantes*

El estrés calórico es uno de los factores más importantes que causan desordenes reproductivos en ganado lechero, pero no se ha observado asociación entre el calor y el riesgo de aborto por *N. caninum*. De todos modos, si se logró observar una relación entre el riesgo de aborto, en el segundo tercio de gestación, y la presencia de épocas de sequía seguidas por lluvias muy intensas; dado que produce de forma directa o indirecta estrés a la vaca preñada, por un lado, porque deben aumentar la producción de calor para mantener su temperatura corporal, y por el otro, porque disminuye la higiene en el medio (Lopez-Gatius *et al.*, 2005). Durante el segundo tercio de la gestación comienza la inmunosupresión en las vacas, pudiendo ocurrir la recrudescencia de la enfermedad (Johnson, 1992 citado por Almería y Lopez-Gatius, 2013) en esa etapa.

Climas templados y húmedos podrían ser considerados potenciales factores de riesgo, dado que favorecen la esporulación de los ooquistes en el medio ambiente, a pesar de que los límites óptimos de temperatura para la esporulación no se han logrado definir (Dubey *et al.*, 2007), si se sabe que es dependiente de la temperatura (Ghalmi *et al.*, 2012). A la vez, éstas condiciones favorecen la proliferación de micotoxinas que, como se mencionó anteriormente, causan inmunosupresión en bovinos, llevando a la recrudescencia de la enfermedad (Dubey *et al.*, 2007).

Se logró determinar una clara relación entre el status de higiene del predio y su seroprevalencia, en donde a mayor higiene, menor era el riesgo de infección (Ghalmi *et al.*, 2012).

- *Alimentar terneros con pool de calostro*

Aunque la infección lactogénica es teóricamente posible, es a nivel práctico muy improbable, de todas maneras, se la debe considerar riesgosa, más aún en tambos en los que una práctica habitual es alimentar a los terneros con pool de calostro (Piaggio *et al.*, 2007). En el trabajo de Corbellini *et al.* (2006) se reportó que en predios que implementaban esta práctica de manejo el riesgo de infección aumentaba 1,79 veces. Siguiendo por esta línea, Romero *et al.* (2017) determinaron como factor de protección que el ternero tome calostro únicamente de su madre, dado que el riesgo de infección se reduce únicamente a ese ternero y no a la totalidad de éstos como en el caso de los que se les suministra pool de calostro.

Esta ruta de transmisión adquiere mayor importancia en predios con altas seroprevalencias y en los que los animales son sometidos a un constante estrés, ya sea por altas temperaturas, restricción alimentaria o enfermedades parasitarias (Romero *et al.*, 2017).

- *Uso de monensina oral*

El uso de monensina se lo determinó como un factor de protección, siendo usado en vacas en producción en forma de bolo para evitar el balance energético negativo en vacas en transición o de alta producción (VanLeeuwen *et al.*, 2010).

- *Densidades de poblaciones humanas*

Esto podría ser considerado un posible factor de riesgo, dado que está altamente asociado al número de perros presentes en la zona (Dubey *et al.*, 2007).

- *Uso de tecnologías reproductivas*

El uso de tecnologías reproductivas, tales como transferencia de embriones y fertilización *in vitro*, fueron factores que se encontraron disminuyen los niveles de infección en predio lecheros (Romero *et al.*, 2017).

10. INFECCIÓN EN HUMANOS

Si bien hay cierta preocupación por el posible potencial zoonótico de esta enfermedad en función de algunas evidencias serológicas de infección en humanos, especialmente en aquellos inmunológicamente deprimidos (Barratt *et al.*, 2010 citado por Donahoe *et al.*, 2015), y Barr *et al.* (1994) lograron infectar de forma experimental a dos monos Macacos (*Macaca mulatta*); aún no se ha demostrado de forma contundente la posible infección en humanos (Dubey *et al.*, 2007; Innes *et al.*, 2005), no detectándose el ADN del parásito en tejidos humanos (Dubey *et al.*, 2002).

11. PÉRDIDAS ECONÓMICAS

Como se describió anteriormente, la neosporosis bovina es una enfermedad de distribución mundial (Dubey *et al.*, 2002), produciendo grandes pérdidas económicas en muchos países por las fallas reproductivas que ocasiona (Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011). En países como Australia y Nueva Zelanda, en donde la Brucelosis ha sido erradicada, *N. caninum* se ha tornado la causa de aborto más frecuente en bovinos, llegando a ser responsable de hasta el 20% de las causas de aborto (Nueva Zelanda) (Reichel *et al.*, 2014).

Además del costo directo que supone la pérdida del ternero, hay una serie de costos indirectos que están implicados y deben ser tenidos en cuenta a la hora de estimar los costos que supone esta enfermedad (Dubey y Schares, 2011). Éstos incluyen: el asesoramiento veterinario, los costos de diagnóstico de preñez, el diagnóstico de aborto (que es caro y difícil), la recría, el aumento de intervalo interparto, la disminución de la producción de leche, número de lactancias y el costo de reemplazo de las vacas que abortaron en caso que se las mande a faena (Thurmond y Hietala, 1997; Trees *et al.*, 1999 citado por Innes *et al.*, 2005; Dubey y Schares, 2011). En cuanto a los costos directos, son variables, ya que dependen básicamente de la edad fetal, el valor genético y la capacidad productiva de la madre (Dubey *et al.*, 2007).

Hall *et al.* (2005) realizaron el seguimiento de un predio con 266 bovinos (144 vacas) durante un año, con una seroprevalencia inicial de 10,6%; no encontrando diferencias significativas en litros de leche producidos por vaca por día, pero si en el número de servicios necesarios para obtener una preñez. Aquellas vacas seropositivas requerían un mayor número de inseminaciones para lograr la preñez que vacas seronegativas (3,5 vs. 2,5, $p=0,06$), si bien los autores lo adjudicaron a la muerte fetal temprana resaltaron que no había evidencia biológica que explicara el porqué.

En cuanto a la tasa de descarte en el rodeo lechero, muchos autores difieren. Por un lado, Cramer *et al.* (2002) no encontraron asociación entre seropositividad a *N. caninum* y el mayor riesgo de ser descartadas, afirmando que la tasa de descarte no se ve afectada por la seropositividad de las vacas. Por el otro, Thurmond y Hietala (1996) reportaron que parte de las pérdidas económicas que ocasiona la enfermedad radica en un descarte más temprano. En su estudio se observó que vacas seropositivas eran descartadas 6,3 meses antes que las seronegativas, teniendo 1,6 veces más riesgo a ser descartadas ($p=0,004$).

Los efectos que tiene esta enfermedad en la producción de leche aún no están claros (Dubey y Schares, 2011), dado que múltiples investigadores han reportado resultados muy diversos. Hay quienes afirman que vacas seronegativas producen mayor cantidad de leche que las seropositivas (Hernandez *et al.*, 2001; Hobson *et al.*, 2002; Tiwari *et al.*, 2007; Pessoa *et al.*, 2016), mientras que otros establecen que no hay diferencia (Doherty *et al.*, 2015), o que incluso vacas seropositivas tienen una mayor producción (Dubey *et al.*, 2007). Hernandez *et al.* (2001) observaron una disminución en la producción lechera de hasta un 3 a 4 %, por medio de un estudio en un predio de 565 vacas, en el modelo se incluyeron factores tales como número de lactaciones, época de parto, presencia de mastitis clínica, edad al parto y existencia de cojeras, de forma de tener en cuenta posibles factores de confusión (Hernández *et al.*, 2001). En un estudio realizado en Canadá, la seropositividad a *N. caninum* se la vio asociada a la baja producción de leche (de 158 litros por lactancia), grasa (5,5 kg por lactancia) y proteínas (3,3 kg por lactancia) en vacas primíparas (Tiwari *et al.*, 2007). De forma similar, en Ontario se realizó un estudio de casos y controles en 3702 vacas Holstein provenientes de 83 tambos, determinándose que por lactación vacas seropositivas producían menor cantidad de leche que seronegativas, pero sólo en los casos en que los predios tuvieran antecedentes de aborto

por *N. caninum* u otros patógenos (Hobson *et al.*, 2002).

Por el contrario, en Irlanda realizaron una investigación con 312 tambos, en los que se evaluó producción de leche, performance reproductiva y mortalidad. El diagnóstico se realizó mediante un kit comercial de ELISA en tanque de leche en 4 oportunidades en el año 2009, considerando a un predio negativo cuando los cuatro resultados fueran negativos. No se observaron diferencias significativas en la producción de leche, pero los costos de reemplazo eran superiores en los predios positivos (Doherty *et al.*, 2015).

Las pérdidas posnatales debidas a *N. caninum* son difíciles de documentar, dado que no hay evidencia de enfermedad en los bovinos adultos aparte de la ocurrencia de abortos (Dubey y Schares, 2011). Si bien se ha reportado que *N. caninum* produce una disminución en las ganancias diarias de peso vivo postdestete y un menor peso de carcasa una vez faenado el animal (Barling *et al.*, 2000b), no se encontraron diferencias en las ganancias diarias en vacas lecheras seropositivas versus seronegativas a *N. caninum* (Moré *et al.*, 2010).

Reichel *et al.* (2013) realizaron una extensa revisión de artículos para discutir las pérdidas económicas que ocasiona este protozooario, en la cual se utilizaron artículos de un total de 10 países, concluyendo de forma general que las pérdidas económicas rondan entorno a 1.298 billones de dólares por año (mediana), con una máxima de 2.380 billones, de éstos gastos 2/3 se le adjudicaron al sector lechero. Se debe tener en cuenta que en este estudio se evaluaron los datos provenientes de 10 países, y los costos y ganancias de éstos sistemas varían de país a país ya que influyen múltiples factores; pero si se puede concluir que los gastos que implica esta enfermedad son mayores para los sistemas lecheros que para los ganaderos. En Argentina se realizó un estudio reciente en donde se estimó que las pérdidas anuales a causa de la neosporosis bovina fueron de US\$ 50 millones (Moore *et al.*, 2013 citado por Reichel *et al.*, 2014).

En Australia se estimó que la mayoría de los tambos con la presencia de *N. caninum* tienen pérdidas de 2 a 5% anual y en predios con alta prevalencia las pérdidas pueden llegar a un 20% anual de forma ocasional (Reichel y Ellis, 2008 citado por Goodswen *et al.*, 2013). Dichas pérdidas varían si el predio sufrió un brote de aborto endémico o epidémico, en caso de un brote de aborto epidémico las pérdidas económicas pueden prolongarse por dos años luego del brote, dado que lleva a un descarte temprano, aumento del intervalo interparto, de la edad al primer parto y por las pérdidas en la producción de leche y costos diagnósticos. Pero, en caso de abortos de tipo endémico se reportó que el 76% de los predios no sufren pérdidas económicas (Bartels *et al.*, 2006b).

12. TRATAMIENTO

A pesar de que la enfermedad es causante de pérdidas productivas, reproductivas y económicas en áreas ganaderas de todo el mundo, hasta el presente no existe tratamiento, quimioterapia (Dubey y Schares, 2011) ni inmunógeno capaz de prevenir la infección en los bovinos (Dubey, 2003).

En los perros, aunque cierto tratamiento puede llevarse a cabo para

disminuir el impacto de la infección, la erradicación no es posible, y no es posible frenar la diseminación de los ooquistes por parte del animal (Almería, 2013).

El tratamiento en el ganado bovino puede parecer poco práctico y caro si se maneja a nivel productivo, dado que por un lado debe ser usado más que nada como una medida de prevención, y por el otro, son tratamientos aplicados a largo plazo en los que durante ese período el animal libera residuos en leche y deja residuos en carne (Dubey y Schares, 2011). Estudios experimentales han determinado que el toltrazuril y el derivado ponazuril son efectivos (Strohbusch *et al.*, 2009 citado por Dubey y Schares, 2011). En bovinos tratados con ponazuril no se logró detectar luego quistes en cerebro ni en ningún otro órgano (Dubey y Schares, 2011). Dado que el toltrazuril es un parasitostático más que un parasiticida (Goodswen *et al.*, 2013), se vio que puede retrasar la diseminación de taquizoitos de forma experimental en ratones y bovinos, pero necesita del apoyo inmunitario de las células T para lograr controlar la infección (Gottstein *et al.*, 2001 citado por Goodswen *et al.*, 2013). Por otro lado, no hay evidencia de que los bradizoitos se vean afectados por este tratamiento (Goodswen *et al.*, 2013).

13. PREVENCIÓN Y CONTROL

Dado que no se ha logrado determinar un tratamiento ni vacuna eficaz para la neosporosis bovina (Almería, 2013; Marugan-Hernandez, 2017) la prevención y control de la enfermedad es esencial para reducir la infección en el ganado bovino (Dubey y Schares, 2011; Marugan-Hernandez, 2017) y así minimizar las pérdidas económicas que esta ocasiona.

Tanto los llamados factores de protección como los factores de riesgo (de infección y de aborto) deben ser tenidos en cuenta para implementar las medidas de control adecuadas (VanLeeuwen *et al.*, 2010). Pero, dado las diferencias anteriormente descritas en los distintos estudios de éstos factores según regiones, tipos de sistemas y manejos, las estrategias de control deberán ser diferentes dependiendo de los sistemas productivos, el manejo realizado en cada predio, la seroprevalencia intra-predial, la vía predominante de infección presente, la existencia de medidas de bioseguridad y según el nivel en que la afección este influyendo en la performance reproductiva y productiva de los animales (Dubey *et al.*, 2007).

Un buen programa de control deberá incluir un análisis económico en el que se considere la relación entre los costos de implementar las medidas de control y las pérdidas que la neosporosis bovina conlleva en el predio (Dubey *et al.*, 2007). Se han venido desarrollando diferentes modelos para determinar cuál es la medida de control más redituable a nivel económico (Fench *et al.*, 1999), pero es importante destacar que éstos estudios realizados parten de realidades productivas y epidemiológicas que son diferentes entre países y regiones, por lo que no deben ser extrapoladas a nuestras condiciones (Piaggio *et al.*, 2007).

A la hora de estudiar qué medidas de control o prevención pueden implementarse en un predio, se deben tener en cuenta múltiples factores. Lo primero es saber si el establecimiento está libre o infectado, dado que en los primeros las medidas estarán orientadas a prevenir la introducción, mientras

que en los infectados lo estarán a disminuir la transmisión de la enfermedad (Dubey *et al.*, 2007). Si el predio ya se encuentra infectado, deberá evaluarse la ruta predominante de infección presente y el patrón de aborto que ocurre en el predio; ya que parecería ser que romper el ciclo del protozoario en uno o varios puntos, debería llevar a la reducción de la infección (Dubey *et al.*, 2007; Reichel *et al.*, 2014). En los rodeos en los que se presentan los abortos endémicos, la medida de control más importante debería ser la identificación y refugio de los animales infectados o seleccionar vaquillonas para la recría provenientes de madres no infectadas (control de transmisión vertical); mientras que en el caso de los abortos epidémicos la principal medida de control a considerar sería el control de los hospederos definitivos (control de transmisión horizontal) (Dubey *et al.*, 2007).

Tratar de erradicar la enfermedad es algo muy discutido por muchos autores, pero de ser factible, será clave que la zona presente un riesgo mínimo de transmisión horizontal, y las medidas de prevención estarán enfocadas en reducir esta fuente de infección (Reichel *et al.*, 2014). De todas maneras, el riesgo de reintroducción de la enfermedad siempre va a estar presente (Guido *et al.*, 2016). Es por eso que hay autores recomiendan que en caso de predios con seroprevalencias muy bajas lo mejor es no implementar medidas de control alguna, ya que la correcta identificación de los animales infectados mediante test de laboratorio o la erradicación de la enfermedad del rodeo (sacrificio de animales seropositivos), sería más costoso que el hecho de convivir con la enfermedad y asumir las bajas pérdidas económicas que la enfermedad ocasiona (abortos, descarte temprano, posible disminución en la producción de leche, etc.) (Reichel *et al.*, 2014). Reichel y Ellis (2006) desarrollaron un modelo económico en el cual se logró determinar que en aquellos predios en donde la prevalencia de la enfermedad era inferior a 18 - 21% era más redituable económicamente convivir con la neosporosis que intentar erradicarla, dado que el costo de identificar a las vacas infectadas superaría el beneficio que ello conlleva (Reichel *et al.*, 2014).

13.1. Control de transmisión horizontal

Como se mencionó a lo largo de la revisión el perro es el hospedero definitivo de mayor importancia, o más bien el único descrito en el Uruguay, por lo que a la hora de tomar medidas para prevenir la transmisión horizontal de esta enfermedad su control es clave. Si bien lo mejor sería evitar la presencia de perros en los establecimientos (Almería y López-Gatius, 2013), se sabe que es una medida muy difícil de implementar. Es por eso que se debe tener la precaución de no dejar cadáveres bovinos, placentas, fetos abortados o cualquier material contaminado en el campo, de forma de evitar que los caninos tengan acceso a ellos (Anderson *et al.*, 2000; Dubey, 2003; Gondim *et al.*, 2004a; Almería, 2013; Reichel *et al.*, 2014). A la vez, prevenir la contaminación fecal de los caninos en el agua y alimento del ganado se debe tratar de llevar adelante (Anderson *et al.*, 2000; Reichel *et al.*, 2014). La fauna silvestre adquiere importancia cuando se quiere controlar este tipo de transmisión, dado que también son fuente de infección para los perros, por lo que es importante evitar que éstos también ingieran material contaminado (Gondim *et al.*, 2004a).

Éstas medidas de control son claves en predios libres, o en aquellos en los que la seroprevalencia es muy baja. De todas formas, el tener un predio libre de neosporosis bovina no garantiza la disminución del riesgo de la infección postnatal, ni la posibilidad de sufrir un brote de aborto epidémico (Moore, 2005).

13.2. Control de transmisión vertical

Múltiples medidas se pueden llevar a cabo para el control de la transmisión vertical, pero éstas dependerán básicamente del sistema productivo y las condiciones del predio. De forma general, se debe evitar el estrés de los animales y promover el bienestar, sobre todo durante el segundo tercio de gestación (Almería y López-Gatius, 2013), para evitar la recrudescencia de la enfermedad y así la transmisión transplacentaria endógena (Dubey *et al.*, 2007; Marugan-Hernandez, 2017).

Si bien la castración o el sacrificio, es el único método efectivo de disminuir la transmisión de las vacas infectadas a su descendencia (Dubey, 2003), el control de la infección podría estar enfocado en reducir el número de vacas infectadas en el rodeo, eliminando aquellas seropositivas con más de dos abortos (Almería y López-Gatius, 2013), y limitar a la vez la introducción de vaquillonas de reemplazo seropositivas (Anderson *et al.*, 2000). El examen serológico de terneros previo a la administración de calostro es una forma útil de diagnosticar a aquellos terneros con infección congénita (Dubey y Schares, 2011).

A continuación, se nombrarán las principales medidas que investigadores recomiendan para el control de esta forma de transmisión:

- *Diagnóstico y descarte (“Test and culling”)*

Antes de comenzar a implementar medidas de control para la neosporosis bovina en un predio es imprescindible conocer el estatus serológico del rodeo (Piaggio *et al.*, 2007). Muchos autores describen que una medida recomendable para reducir la transmisión vertical en un predio es la de realizar prueba diagnóstica a las vacas y descartar las seropositivas (Pabón *et al.*, 2007) o aquellas seropositivas con historia de aborto (Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011). Si bien esta es una medida muy eficaz para disminuir la seroprevalencia, usualmente no es viable dado el costo económico que implica (Dubey *et al.*, 2007; Hasler *et al.*, 2008 citado por Dubey y Schares, 2011). Otra opción puede ser la inseminación de vacas seropositivas con semen de biotipos carniceros o bien excluir de la recría aquellas vaquillonas seropositivas (Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011).

La implementación de una o más de éstas medidas han demostrado que disminuye notoriamente la seroprevalencia predial (Hall *et al.*, 2005; Pabón *et al.*, 2007). Para poder implementar esta forma de prevención es importante que los niveles de infección horizontal sean bajos y la prevalencia intapredial también lo sea. Siendo una buena manera de bloquear la infección vertical, y de forma indirecta reducir el riesgo de transmisión horizontal al haber menos material infectado (placenta y fetos abortados) (Hall *et al.*, 2005). De todas maneras, antes de implementar esta estrategia se deben analizar los factores de riesgo presentes en el predio (Dubey *et al.*,

2007).

- *Manejo recria*

Dado que gran parte de los problemas reproductivos que produce esta enfermedad son debido a los animales congénitamente infectados, es recomendable la no utilización de hembras seropositivas para el reemplazo (French *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 2014). Para esto, dado que no es rentable realizarles un test a todas las hembras nacidas en el predio (lo que se debería hacer pre-calostroado o luego de los seis meses de vida) sumado a la alta eficiencia de la transmisión vertical, una opción práctica es la no utilización de hembras para el reemplazo hijas de vacas seropositivas. A la vez, es importante que no se introduzcan animales seropositivos en el predio (Reichel *et al.*, 2014).

Esta forma de control va a depender en gran medida de la seroprevalencia intra-predial, es recomendable implementarla en predios con seroprevalencias superiores al 50% (Hasler *et al.*, 2008 citado por Dubey y Schares, 2011). French *et al.* (1999) demostraron mediante modelos matemáticos determinísticos y estocásticos que, si bien a corto plazo las medidas de control más eficaces son el descarte de hembras infectadas y evitar que se utilicen hembras de reemplazo seropositivas, a largo plazo éstas medidas dependen mucho del grado de transmisión horizontal que esté presente en el predio.

- *Utilización de razas más resistentes*

Como bien se mencionó, en aquellos rodeos bovinos lecheros con alta prevalencia y altas tasas de aborto por *N. caninum*, se puede utilizar semen de razas carniceras para inseminar a las vacas infectadas (Almería *et al.*, 2009; Pabon *et al.*, 2007), dado que se ha observado que reduce la incidencia de aborto, especialmente si se utiliza semen proveniente de toros de raza Limousin (Almería *et al.*, 2009). Esto puede ser debido a que se da un efecto favorable en la función protectora de la placenta por el cruce de los dos biotipos (Dubey y Schares, 2011), estando asociado a una alta concentración de glicoproteínas asociadas a la preñez (PAG) (Lopez-Gatius *et al.*, 2005 citado por Monney y Hemphill, 2014).

Esta medida, permite prolongar el número de lactancias en vacas seropositivas, disminuyendo la incidencia de abortos (Almería y López-Gatius, 2013). A la vez es una forma de asegurar que los reemplazos hijas de vacas infectadas sean descartadas, dado que este tipo de cruce no suele ser usada para la producción de leche (Pabón *et al.*, 2007; Almería y López-Gatius, 2013; Guido *et al.*, 2016).

- *Transferencia de embriones*

La transferencia de embriones ha demostrado ser muy efectiva para interrumpir el ciclo de *N. caninum* (Reichel *et al.*, 2014). Es una medida que se puede implementar en aquellas vacas seropositivas que tienen un alto valor genético transfiriendo sus embriones a vacas receptoras seronegativas. Esto se ha demostrado que elimina el riesgo de infección del feto dado que evita la transmisión transplacentaria endógena (Baillargeon *et*

al., 2001; Dubey y Schares, 2011). Es de vital importancia que la receptora sea seronegativa, dado que en el caso contrario el feto se infectará independientemente de la condición de las donantes (Martínez *et al.*, 2015).

13.3. Uso de herramientas diagnósticas

Como bien se mencionó, a la hora de implementar medidas para el control de la enfermedad es importante primero conocer el estatus de infección del rodeo (Reichel *et al.*, 2014), lo que nos permitirá por un lado detectar la infección de vacas abortadas para su posterior descarte, y por el otro, conocer la ruta predominante de infección que está presente en el predio, para así poder optar por las medidas de control más convenientes (Dubey *et al.*, 2007).

Para poder determinar la ruta de infección predominante se puede, o bien remitir al laboratorio muestras pareadas madre – hijo (del cual se debe tomar suero pre-calostro) (Dubey, 1999), o en caso de no ser posible, es posible realizar un muestreo uniforme entre categorías para observar la distribución por edad de animales seropositivos (Dubey *et al.*, 2007). En caso que sea la transmisión vertical la predominante, se observará una correlación en la seropositividad de madres e hijos y la distribución de la infección por edad será uniforme; en caso de ser horizontal, no se encontrará dicha correlación y se observarán clusters por edad (Dubey *et al.*, 2007; Guido *et al.*, 2016). Por otro lado, hoy en día existen pruebas que permiten diferenciar una infección aguda de una crónica (Dubey y Schares, 2011). A éstos test se le llaman test de avidéz, siendo muy útiles también para realizar en vacas abortadas y así diferenciar patrones de aborto. En los casos en que se encuentre una alta avidéz corresponde a una infección crónica, por lo que la ruta predominante de infección será la de tipo vertical y los abortos se darán de forma endémica. En caso de que la avidéz sea baja, la infección será aguda y la ruta de infección será básicamente la horizontal, siendo el patrón de aborto epidémico (Scharés *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2007).

En cuanto a la serología de los perros, no es un indicador útil de la infección en bovinos dado que pueden ser hospederos intermediarios, no significando ningún riesgo de contagio para los bovinos ya que no eliminará oocistes (Dubey y Lindsay, 1996).

13.4. Vacunación

A pesar de que la vacunación de los bovinos es la forma de control que ha demostrado ser la más recomendable (French *et al.*, 1999) y más aún en predios de alta seroprevalencia (Monney y Hemphill, 2014), no está disponible comercialmente y aún es necesario su perfeccionamiento (Dubey y Schares, 2011; Goodswen *et al.*, 2013).

Hay evidencias de que algunas vacas infectadas con *N. caninum* desarrollan cierto grado de inmunidad contra el aborto y la transmisión vertical (Innes *et al.*, 2001), lo que indica que implementar esta medida puede ser posible. A pesar de eso la situación es diferente si en el animal o predio predomina la transmisión transplacentaria endógena o exógena (Dubey *et al.*, 2007), ya que se ha visto que protegen contra infecciones exógenas (Innes *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2003) pero no contra infecciones transplacentarias endógenas (Williams *et al.*, 2003).

Diferentes tipos de vacunas han sido investigadas, vacunas vivas de aislamientos naturales de baja virulencia, cepas atenuadas y cepas genéticamente modificadas por transgénesis (Monney y Hemphill, 2014). Si bien las vacunas muertas son una alternativa segura, ofrecen una baja protección contra la transmisión vertical (Williams *et al.*, 2007; Monney y Hemphill, 2014). Una vacuna eficiente para la neosporosis debería de tener determinadas características: prevención de la proliferación de taquizoitos y su diseminación en los bovinos preñados de forma de prevenir la transmisión vertical y la prevención de la formación de quistes tisulares. Esto se lograría con una vacuna que indujera el desarrollo de inmunidad celular y estimulara la producción de anticuerpos tanto a nivel de la mucosa como de forma sistémica (Monney y Hemphill, 2014). Hoy en día, la evidencia sugiere que la vacuna más prometedora para evitar la infección de *N. caninum* en el rodeo será una vacuna viva de una cepa de baja virulencia como lo es la cepa Nc-Nowra (Williams *et al.*, 2007 citado por Monney y Hemphill, 2014), siendo que no parecería ser específica de la cepa actuante (Williams *et al.*, 2007).

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguado-Martínez A, Álvarez-García G, Arnaiz-Seco I, Innes E, Ortega-Mora LM. (2005). Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 17(5): 442-450.
2. Aguado-Martínez A, Álvarez-García G, Fernández-García A, Risco-Castillo V, Arnaiz-Seco I, Rebordosa-Trigueros X, Navarro-Lozano V, Ortega-Mora LM. (2008). Usefulness of rNcGRA7-and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Veterinary parasitology* 157(3): 182-195.
3. Almería S, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Nogareda C, Bech-Sàbat G, Serrano B, Santolaria P, Yániz JL. (2009). Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. *Veterinary parasitology* 163(4): 323-329.
4. Almería S, López-Gatius F. (2013). Bovine neosporosis: clinical and practical aspects. *Research in veterinary science* 95(2): 303-309.
5. Almería S. (2013). *Neospora caninum* and Wildlife. ISRN parasitology 2013.
6. Álvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor-Fernández I, Ortega-Mora LM. (2013). Serological diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary parasitology* 198(1): 85-95.
7. Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H. (1995). Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207(9): 1206-1210.
8. Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. (2000). Neosporosis in cattle. *Animal reproduction science* 60: 417-431.
9. Ansari-Lari M, Rowshan-Ghasrodashti A, Jesmani H, Masoudian M, Badkoobeh M. (2017). Association of *Neospora caninum* with reproductive performance in dairy cows: A prospective study from Iran. In *Veterinary Research Forum* 8(2): 109-114.
10. Asmare K, Regassa F, Robertson LJ, Skjerve E. (2013). Seroprevalence of *Neospora caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia. *Veterinary parasitology* 193(1-3): 85-94.
11. Bahrami S, Hamidinejat H, Fatemi-Tabatabaei SR, Sardarifar S. (2018). Effect of natural neosporosis on bull sperm quality. *Tropical animal health and production* 50(1): 85-89.
12. Baillargeon P, Fecteau G, Paré J, Lamothe P, Sauvé R. (2001). Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling

- vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association 218(11): 1803-1806.
13. Bandini LA, Neto AFA, Pena HFJ, Cavalcante GT, Schares G, Nishi SM, Gennari SM. (2011). Experimental infection of dogs (*Canis familiaris*) with sporulated oocysts of *Neospora caninum*. Vet. Parasitol 176:151–156.
 14. Bañales P, Fernandez L, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA, Osawa T. (2006). A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. Veterinary parasitology 139(1): 15-20.
 15. Barber JS, Gasser RB, Ellis J, Reichel MP, McMillan D, Trees AJ. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. The Journal of parasitology 83(6):1056-1058.
 16. Barling KS, McNeill JW, Thompson JA, Paschal JC, McCollum III FT, Craig TM, Adams LG. (2000)a. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. Journal of the American Veterinary Medical Association 217(9): 1356-1360.
 17. Barling KS, Sherman M, Peterson MJ, Thompson JA, McNeill JW, Craig TM, Adams LG. (2000)b. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. Journal of the American Veterinary Medical Association 217(9): 1361-1365.
 18. Barling KS, McNeill JW, Paschal JC, McCollum III FT, Craig TM, Adams LG, Thompson JA. (2001). Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. Preventive Veterinary Medicine 52(1): 53-61.
 19. Bartels CJM, Wouda W, Schukken YH. (1999). Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). Theriogenology 52(2): 247-257.
 20. Bartels CJM, Arnaiz-Seco JI, Ruiz-Santa-Quitera A, Björkman C, Frössling J, Von Blumröder D, Conraths FJ, Schares G, van Maanen C, Wouda W, Ortega-Mora L M. (2006). Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. Veterinary Parasitology 137(1-2): 17-27.
 21. Björkman C, Uggla A. (1999). Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. International Journal for Parasitology 29(10): 1497-1507.
 22. Buxton D, McAllister MM, Dubey JP. (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis. Trends in parasitology 18(12): 546-552.
 23. Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA. (1998). *Neospora caninum*-associated

- abortion in a dairy herd in Argentina. *Veterinary Record* 143(8): 228-229.
24. Canada N, Carvalheira J, Meireles CS, da Costa JMC, Rocha A. (2004). Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. *Theriogenology* 62(7): 1229-1235.
 25. Cedeño Q, Benavides B. (2013). Seroprevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* in dairy cattle herds in the municipality of Pasto, Colombia. *Revista MVZ Córdoba* 18(1): 3311-3316.
 26. Cedillo CJR, Martínez MJJ, Santacruz AM, Banda RVM, Morales SE. (2008). Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 154(1-2): 151-155.
 27. Cobo A, Pacheco J, Freire A, Gurgitano J. (1999). 1º Diagnóstico de Aborto Bovino asociado a *Neospora caninum* en Uruguay. *Prácticas Veterinarias* 2:5-6.
 28. Collantes-Fernández E, Rodríguez-Bertos A, Arnáiz-Seco I, Moreno B, Aduriz G, Ortega-Mora LM. (2006). Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions in aborted bovine foetuses. *Theriogenology* 65(3): 629-641.
 29. Corbellini LG, Smith DR, Pescador CA, Schmitz M, Correa A, Steffen DJ, Driemeier D. (2006). Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Preventive veterinary medicine* 74(2-3): 130-141.
 30. Cotryba. (2017). Estudio Cuantificación y caracterización de la población canina de Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/comision-de-tenencia-responsable-y-bienestar-animal/institucional/informes-de-cotryba/estudio-sobre-poblacion-canina> [Verificado 27 Julio 2018].
 31. Cramer G, Kelton D, Duffield TF, Hobson JC, Lissemore K, Hietala SK, Peregrine AS. (2002). *Neospora caninum* serostatus and culling of Holstein cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221(8):1165-1168.
 32. Davison HC, Otter A, Trees AJ. (1999). Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *International journal for parasitology* 29(10): 1683-1689.
 33. Davison HC, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Williams DJL, Kelly DF, Trees AJ. (2001). Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Research in Veterinary Science* 70(2): 163-168.
 34. de Barros LD, Miura AC, Minutti AF, Vidotto O, Garcia JL. (2018). *Neospora caninum* in birds: A review. *Parasitology international* 67: 397-402.

35. De Marez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, Gasbarre L. (1999). Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *International Journal for Parasitology* 29(10): 1647-1657.
36. DIEA y MGAP. (2014). Anuario estadístico Agropecuario 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2014/Diea-Anuario%202014-Digital01.pdf> [Verificado 05 Agosto 2016].
37. DIEA y MGAP. (2016). Anuario estadístico Agropecuario 2016. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016> [Verificado 30 Septiembre 2017].
38. Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W. (2003). Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. *Veterinary Parasitology* 110(3): 161-169.
39. Doherty E, Sayers R, O'Grady L, Shalloo L. (2015). Effect of exposure to *Neospora caninum*, Salmonella, and Leptospira interrogans serovar Hardjo on the economic performance of Irish dairy herds. *Journal of dairy science* 98(4): 2789-2800.
40. Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Šlapeta J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4(2): 216-238.
41. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla ANDA. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192(9): 1269-1285.
42. Dubey JP, Lindsay DS. (1996). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary parasitology* 67(1-2): 1-59.
43. Dubey JP. (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary parasitology* 84(3-4): 349-367.
44. Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Björkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis JT, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJL, Lindsay DS. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International journal for parasitology*, 32(8), 929-946.
45. Dubey JP. (2003). Review of *Neospora caninum* and Neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology* 41(1): 1-16.
46. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of comparative pathology* 134(4): 267-289.
47. Dubey JP, Schares G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary parasitology* 140(1-2): 1-34.

48. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews* 20(2): 323-367.
49. Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, Kwok OCH, Choudhary S. (2011). Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 181(2-4): 382-387.
50. Dubey JP, Schares G. (2011). Neosporosis in animals—the last five years. *Veterinary parasitology* 180(1-2): 90-108.
51. Duong MC, Alenius S, Huong LTT, Björkman C. (2008). Prevalence of *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam. *The Veterinary Journal* 175(3): 390-394.
52. Easton C, Paullier C, Bañales P. (2003). Aborto bovino: casuística y optimización del diagnóstico en la DILAVE “Miguel C. Rubino”, Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 38: 25-30.
53. Ekici OD, Isik N, Sayin Z, Coskun A, Sajid MS. (2018). Serosurveillance of *Neospora caninum* and *Brucella* species in Dairy Cattle of Konya, Turkey. *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE AND BIOLOGY* 20(4): 711-714.
54. Fávero JF, Da Silva AS, Campigotto G, Machado G, de Barros LD, Garcia JL, Vogel FF, Mendes RE, Stefani LM. (2017). Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. *Microbial pathogenesis* 110: 202-207.
55. French NP, Clancy D, Davison HC, Trees AJ. (1999). Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *International Journal for Parasitology* 29(10): 1691-1704.
56. Fereig RM, AbouLaila MR, Mohamed SG, Mahmoud HY, Ali AO, Ali AF, Hilali M, Zaid A, Mohamed AEA, Nishikawa Y. (2016). Serological detection and epidemiology of *Neospora caninum* and *Cryptosporidium parvum* antibodies in cattle in southern Egypt. *Acta tropica* 162: 206-211.
57. Ferre I, Serrano-Martínez E, Martínez A, Osoro K, Mateos-Sanz A, Del-Pozo I, Aduriz G, Tamargo C, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM. (2008). Effects of re-infection with *Neospora caninum* in bulls on parasite detection in semen and blood and immunological responses. *Theriogenology* 69(7): 905-911.
58. Ghalmi F, China B, Ghalmi A, Hammitouche D, Losson B. (2012). Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. *Research in veterinary science* 93(2): 655-661.
59. Gindri PC, Mion B, Pradieé J, Bialves TS, Souza GND, Dellagostin OA, Schneider A, Pegoraro LMC. (2018). Seroprevalence estimate and associated risk factors for neosporosis in dairy cattle in the

northwest region of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Ciência Rural* 48(7).

60. Gondim LFP, Sartor IF, Hasegawa M, Yamane I. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology* 86(1): 71-75.
61. Gondim LFP, McAllister MM, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME. (2004)a. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *Journal of Parasitology* 90(6): 1361-1365.
62. Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. (2004)b. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 34(2): 159-161.
63. Gondim LFP, McAllister MM, Anderson-Sprecher RC, Björkman C, Lock TF, Firkins LD, Gao L, Fischer WR. (2004)c. Transplacental transmission and abortion in cows administered *Neospora caninum* oocysts. *Journal of Parasitology* 90(6): 1394-1400.
64. Gondim LFP, McAllister MM, Gao L. (2005). Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology* 134(1-2): 33-39.
65. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. (2013). A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution* 13: 133-150.
66. Guido S, Katzer F, Nanjiani I, Milne E, Innes EA. (2016). Serology-based diagnostics for the control of bovine neosporosis. *Trends in parasitology* 32(2): 131-143.
67. Guimaraes JS, Souza SLP, Bergamaschi DP, Gennari SM. (2004) Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. *Veterinary Parasitology* 124(1): 1-8.
68. Guy CS, Williams DJ, Kelly DF, McGarry JW, Guy F, Björkman C, Smith RF, Trees AJ. (2001). *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *The Veterinary record* 149(15): 443-449.
69. Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. (2005). *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary parasitology* 128(3-4): 231-241.
70. Hernandez J, Risco C, Donovan A. (2001). Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219:632-635.
71. Hervé-Claude L, Lavado A, Rivera O, Navarrete-Talloni M, Hamilton-West M. (2017). Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in small dairy farms in central Chile. *Revista MVZ Córdoba* 22(1): 5666-5673.
72. Hobson JC, Duffield TF, Kelton D, Lissemore K, Hietala SK, Leslie KE, McEwen B, Cramer G, Peregrine AS. (2002). *Neospora caninum*

- serostatus and milk production of Holstein cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221:1160 -1164.
73. Hobson JC, Duffield TF, Kelton D, Lissemore K, Hietala SK, Leslie KE, McEwen B, Peregrine AS. (2005). Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Veterinary parasitology* 127(3-4): 177-188.
 74. Hughes JM, Thomasson D, Craig PS, Georjin S, Pickles A, Hide G. (2008). *Neospora caninum*: detection in wild rabbits and investigation of co-infection with *Toxoplasma gondii* by PCR analysis. *Experimental Parasitology* 120(3): 255-260.
 75. Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM, Buxton D. (2001). Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *International Journal for Parasitology* 31(13): 1523-1534.
 76. Innes EA, Andrianarivo AG, Björkman C, Williams DJ, Conrad PA. (2002). Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology* 18(11): 497-504.
 77. Innes EA, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D. (2005). The host–parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary immunology and immunopathology* 108(1-2): 29-36.
 78. Innes EA. (2007). The host-parasite relationship in pregnant cattle infected with *Neospora caninum*. *Parasitology* 134(13): 1903-1910.
 79. Jenkins M, Baszler T, Björkman C, Schares G, Williams D. (2002). Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *International Journal for Parasitology* 32(5): 631-636.
 80. Jensen AM, Björkman C, Kjeldsen AM, Wedderkopp A, Willadsen C, Ugglå A, Lind P. (1999). Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Preventive veterinary medicine* 40(3-4): 151-163.
 81. Justo RV, Manfio JB, Galhardo JA, Garcia JL, Campos AK. (2013). Seroepidemiological inquiry on bovine neosporosis in northern Mato Grosso state, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* 34(6Supl2): 3897-3902.
 82. Kashiwazaki Y, Giannechini RE, Lust M, Gil J. (2004). Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Veterinary parasitology* 120(1-2): 139-144.
 83. King JS, Šlapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. (2010). Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 40(8): 945-950.
 84. Klauck V, Machado G, Pazinato R, Radavelli WM, Santos DS, Berwaguer JC, Braunig P, Bogel FF, Da Silva AS. (2016). Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. *Microbial pathogenesis* 92: 46-49.

85. Landmann JK, Gunn AA, O'Donoghue PJ, Tranter WP, McGowan MR. (2011). Epidemiology and impact of *Neospora caninum* infection in three Queensland tropical dairy herds. *Reproduction in domestic animals* 46(4): 734-737.
86. Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology* 82(4): 327-333.
87. Lista-Alves D, Palomares-Naveda R, García F, Obando C, Arrieta D, Hoet AE. (2006). Serological evidence of *Neospora caninum* in dual-purpose cattle herds in Venezuela. *Veterinary parasitology* 136(3): 347-349.
88. López-Gatius F, Pabón M, Almeria S. (2004). *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 62(3-4): 606-613.
89. López-Gatius F, Santolaria P, Almeria S. (2005). *Neospora caninum* infection does not affect the fertility of dairy cows in herds with high incidence of Neospora-associated abortions. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 52(1): 51-53.
90. Macedo CABD, Macedo MFSBD, Miura AC, Taroda A, Cardim ST, Innes EA, Katzer F, Cantón GJ, Chianini F, Headley FA, Garcia JL. (2017). Occurrence of abortions induced by *Neospora caninum* in dairy cattle from Santa Catarina, southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 26(3): 292-298.
91. Maley SW, Buxton D, Rae AG, Wright SE, Schock A, Bartley PM, Esteban-Redondo I, Swales C, Hamilton CM, Sales J, Innes EA. (2003). The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *Journal of comparative pathology* 129(2-3): 186-195.
92. Marsh AE, Barr BC, Packham AE, Conrad PA. (1998). Description of a new *Neospora* species (Protozoa: Apicomplexa: Sarcocystidae). *The Journal of parasitology* 88: 983-991.
93. Martínez RB, León VG, Álvarez JC. (2015). Neosporosis en animales domésticos: una revisión. *Journal of Agriculture and Animal Sciences* 4(1):64-73.
94. Martinez BAF, Leotti VB, Borba MR, e Silva GDS, Corbellini LG. (2017). Can hierarchical modeling improve our understanding of bovine abortion due to *Neospora caninum* infection?. *Veterinary parasitology* 237: 77-82.
95. Marugan-Hernandez V. (2017). *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. *Journal of comparative pathology* 157(2): 193-200.
96. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. (1998). Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 28(9): 1473-1479.

97. McAllister MM, Björkman C, Anderson-Sprecher R, Rogers DG. (2000). Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 217(6): 881-887.
98. Monney T, Hemphill A. (2014). Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies?. *Experimental parasitology* 140: 52-70.
99. Moore DP, Campero CM, Odeón AC, Posso MA, Cano D, Leunda MR, Basso W, Venturini MC, Späth E. (2002) Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Veterinary Parasitology* 107(4): 303-316.
100. Moore DP. (2005). Neosporosis in South America. *Veterinary parasitology* 127(2): 87-97.
101. Moore DP, Pérez A, Agliano S, Brace M, Cantón G, Cano D, Leunda MR, Odeón AC, Odriozola E, Campero CM. (2009). Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. *Veterinary parasitology* 161(1): 122-125.
102. Elizabeth MS, Francisco JTT, Froylan IV, Puente EC, Santacruz M. (2001). Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 13(5): 413-415.
103. Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Venturini MC, Venturini L. (2009). Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Veterinary parasitology* 160(1-2): 51-54.
104. Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Venturini MC, Venturini L. (2010). Serologic profiles for *Sarcocystis* sp. and *Neospora caninum* and productive performance in naturally infected beef calves. *Parasitology research* 106(3): 689-693.
105. Nam NH, Aiumlamai S, Chanlun A, Kanistanon K. (2011). Diagnosis of *Neospora caninum* infection in animals. *J. Sci. Dev.* 9(1): 146 – 154.
106. Ogawa L, Freire RL, Vidotto O, Gondim LFP, Navarro IT. (2005). Occurrence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dairy cattle from the northern region of the Paraná State, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57(3): 312-316.
107. Ortega-Mora LM, Ferre I, del-Pozo I, Caetano-da-Silva A, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Ugarte-Garagalza C, Aduriz G. (2003). Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. *Veterinary Parasitology* 117(4): 301-308.
108. Ortega-Mora L, Fernández-García A, Gómez-Bautista M. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. *Acta Parasitologica* 51(1): 1-14.

109. Osawa T, Wastling J, Acosta L, Ortellado C, Ibarra J, Innes EA. (2002). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Veterinary parasitology* 110(1): 17-23.
110. Otranto D, Llazari A, Testini G, Traversa D, di Regalbono AF, Badan M, Capelli G. (2003). Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Veterinary parasitology* 118(1): 7-18.
111. Ould-Amrouche A, Klein F, Osdoit C, Mohammed HO, Touratier A, Sanaa M, Mialot JP. (1999). Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Veterinary Research* 30(5): 531-538.
112. Pabón M, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Bech-Sàbat G, Nogareda C, Almería S. (2007). Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. *Veterinary parasitology* 147(1): 40-46.
113. Patitucci AN, Perez MJ, Israel KF, Rozas MA. (2000). Prevalence of *Neospora caninum* in two dairy herds of the IX Region of Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 32: 209–214.
114. Peregrine AS, Duffield TF, Wideman G, Kelton D, Hobson J, Cramer G, Hietala SK. (2004). Udder health in dairy cattle infected with *Neospora caninum*. *Preventive veterinary medicine* 64(2-4): 101-112.
115. Pessoa GA, Martini AP, Trentin JM, Dalcin VC, Leonardi CEP, Vogel FSF, de Sá Filho MF, Rubin MIB, Silva CAM. (2016). Impact of spontaneous *Neospora caninum* infection on pregnancy loss and subsequent pregnancy in grazing lactating dairy cows. *Theriogenology* 85(3): 519-527.
116. Piaggio J. (2006). Estudio transversal de Neosporosis en la principal cuenca lechera del Uruguay. Tesis maestría, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.
117. Piaggio J, Delucchi L, Bañales P, Easton C. (2007). Actualización en neosporosis. GEGA S.R.L 1a ed. Montevideo.
118. Portocarrero C, Pinedo R, Falcón N, Chávez A. (2015). Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos naturalmente infectados en la ceja de selva de Oxapampa, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 26(1): 119-126.
119. Pulido-Medellín MO, García-Corredor DJ, Vargas-Abella JC. (2016). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en un Hato Lechero de Boyacá, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 27(2): 355-362.
120. Puray NC, Chavez AV, Casas EA, Falcon PN, Casas GV. (2006). Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 17: 189–194.

121. Rao JNK, Scott AJ. (1984). On chi-squared tests for multiway contingency tables with cell proportions estimated from survey data. *Annals of Statistics* 12: 46-60.
122. Reichel MP, Ayanegui-Alcérreca MA, Gondim LF, Ellis JT. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. *International journal for parasitology* 43(2): 133-142.
123. Reichel MP, McAllister MM, Pomroy WE, Campero C, Ortega-Mora LM, Ellis JT. (2014). Control options for *Neospora caninum*—is there anything new or are we going backwards?. *Parasitology* 141(11): 1455-1470.
124. Reiterová K, Špilovská S, Antolová D, Dubinský P. (2009). *Neospora caninum*, potential cause of abortions in dairy cows: the current serological follow-up in Slovakia. *Veterinary parasitology* 159(1): 1-6.
125. Rinaldi L, Pacelli F, Lovane G, Pagnini U, Veneziano V, Fusco G, Cringoli G. (2007). Survey of *Neospora caninum* and bovine herpes virus 1 coinfection in cattle. *Parasitology research* 100(2): 359-364.
126. Romero JJ, Perez E, Dolz G, Frankena K. (2002). Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Preventive veterinary medicine* 53(4): 263-273.
127. Romero R, de Oliveira CSF, Lopes LB, Rodrigues RO, Haddad JPA. (2017). Prevalence and risk factors associated with anti-*Neospora caninum* antibodies in dairy herds in the central region of Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 10: 71-74.
128. Schares G, Bärwald A, Staubach C, Söndgen P, Rauser M, Schröder R, Peters M, Wurm R, Selhorst T, Conraths FJ. (2002). p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary parasitology* 106(4): 293-305.
129. Schares G, Bärwald A, Staubach C, Ziller M, Klöss D, Schroder R, Labohm R, Dräger K, Fasen W, Hess RG, Conraths FJ. (2004). Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology* 129:301–309.
130. Serrano E, Ferre I, Osoro K, Aduriz G, Mateos-Sanz A, Martinez A, Atxaerandio R, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM. (2006). Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. *Veterinary parasitology* 135(3): 197-203.
131. Serrano-Martinez E, Ferre I, Osoro K, Aduriz G, Mota RA, Martínez A, del Pozo I, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM. (2007). Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology* 67(4): 729-737.

132. Sobrino R, Dubey JP, Pabón M, Linarez N, Kwok OC, Millán J, Arnal MC, Luco DF, López-Gatius F, Thulliez P, Gortázar C, Almería S. (2008). *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Veterinary parasitology* 155(3-4): 190-197.
133. Söndgen P, Peters M, Bärwald A, Wurm R, Holling F, Conraths FJ, Schares G. (2001). Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Veterinary Parasitology* 102(4): 279-290.
134. Thilsted JP, Dubey JP. (1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1(3): 205-209.
135. Thurmond MC, Hietala SK. (1996). Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *American journal of veterinary research* 57(11): 1559-1562.
136. Thurmond MC, Hietala SK. (1997). Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first -lactation dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210:672-674.
137. Tiwari A, VanLeeuwen JA, Dohoo IR, Keefe GP, Haddad JP, Tremblay R, Scott HM, Whiting, T. (2007). Production effects of pathogens causing bovine leukosis, bovine viral diarrhoea, paratuberculosis, and neosporosis. *Journal of dairy science* 90(2): 659-669.
138. Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Scott HM. (2010). Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Preventive veterinary medicine* 93(2-3): 129-138.
139. Williams DJL, Guy CS, McGarry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Cripps PJ, Kelly DF, Trees AJ. (2000). *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121(4): 347-358.
140. Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Guy F, McGarry JW, McKay JS, Trees AJ. (2003). First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology* 33(10): 1059-1065.
141. Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Ellis J, Björkman C, Reichel MP, Trees AJ. (2007). Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infection and immunity* 75(3): 1343-1348.
142. Williams DJL, Hartley CS, Björkman C, Trees AJ. (2009). Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*—how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology* 136(14): 1895-1900.
143. Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. (1997). Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *The Journal of parasitology* 83(3): 545-547.

144. Yildiz K, Kul O, Babur C, Kılıc S, Gazyagcı AN, Celebi B, Gurcan IS. (2009). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle ranches with high abortion rate: Special emphasis to serologic co-existence with *Toxoplasma gondii*, *Brucella abortus* and *Listeria monocytogenes*. *Veterinary parasitology* 164(2-4): 306-310.

CAPÍTULO II: Caracterización del problema

La neosporosis bovina es una enfermedad de distribución mundial (Reichel *et al.*, 2013), si bien la principal pérdida reproductiva radica en la ocurrencia de abortos, otras pérdidas incluyen la posible disminución de la producción de leche en vacas seropositivas (Thurmond y Hietala, 1997; Hernández *et al.*, 2001; Hobson *et al.*, 2002) y aumento de las tasas de refugio temprano (Thurmond y Hietala, 1996).

En Uruguay el último reporte poblacional en lechería data de hace más de diez años, en donde se encontró que el protozooario estaba ampliamente difundido entre los predios lecheros (Piaggio, 2006). Dado que no existe ni tratamiento ni una vacuna eficaz contra esta enfermedad (Marugan-Hernandez, 2017), es indispensable implementar correctas medidas de control y prevención para reducir y prevenir la infección en el ganado (Dubey y Schares, 2011; Marugan-Hernandez, 2017). Las medidas correctas a adoptar suelen estar influenciadas por el tipo de sistema productivo, las medidas de manejo y de bioseguridad que se realizan en cada predio, la seroprevalencia intra-predial, la vía predominante de infección presente, y según el nivel en que la afección esté influyendo en la performance reproductiva y productiva de los animales (Dubey *et al.*, 2007). Es por este motivo que consideramos esencial que las estrategias de control se basen en las condiciones productivas de cada país o región.

De esta manera, se buscará actualizar los datos de seroprevalencia en el rebaño bovino lechero del Uruguay e identificar potenciales factores de riesgo o protección vinculados a altos niveles de infección en los rebaños, de forma de implementar medidas de control y prevención que se adecuen a nuestras condiciones productivas y mejorar la comprensión epidemiológica de *Neospora caninum*.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

- Estudio de la seroprevalencia e identificación de posibles factores asociados a *Neospora caninum* en el rebaño bovino lechero del Uruguay.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la seroprevalencia de *Neospora caninum* individual y predial a nivel nacional.
- Estudiar la asociación entre la seroprevalencia de *Neospora caninum* y el tamaño de los predios lecheros.
- Evaluar la asociación entre la seroprevalencia de *Neospora caninum* y potenciales factores de riesgo, como ser:
 - Características generales del predio, medidas de manejo, medidas y características sanitarias, e indicadores reproductivos.
 - Cantidad de caninos y aves de corral presentes en el predio.
 - Los movimientos de ingreso de animales susceptibles (entradas) de los predios durante el período comprendido entre julio 2014 a julio 2015.
- Establecer la distribución geográfica de los predios con neosporosis bovina e identificar la existencia de conglomerados espaciales.

CAPÍTULO III: Seroprevalencia de la neosporosis bovina en el rebaño lechero del Uruguay

RESUMEN

La Neosporosis bovina es una enfermedad de distribución mundial, siendo responsable de grandes pérdidas económicas en ganado bovino, dado que es una de las causas más importantes de aborto. El último estudio de seroprevalencia realizado en el Uruguay fue hace más de diez años, y es reconocible que los sistemas productivos del país han cambiado sustancialmente, por lo que el objetivo de este estudio fue determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en el rebaño bovino lechero del Uruguay, tanto a nivel individual como predial. Para esto, se desarrolló un estudio transversal en 102 establecimientos lecheros en el segundo semestre del año 2015. Se realizó un muestreo aleatorio estratificado a nivel de establecimientos según el tamaño de la población bovina (1 a 50 bovinos, 50 a 250 bovinos, más de 250 bovinos), siendo muestreadas hasta 60 vacas adultas por establecimiento. La serología se determinó por medio de la prueba ELISA indirecto (ID Vet, Grabels, Francia), bajo las recomendaciones del fabricante en un total de 4.223 bovinos. La seroprevalencia aparente estimada proyectada a la población de bovinos en función del diseño fue de $22,3 \pm 1,8$ % (intervalo de confianza (IC) 95%, 18,7-25,9 %), con una prevalencia a nivel predial de $96,0 \pm 1,9$ % (IC 95%, 92,1-99,8%). Dicha prevalencia predial tendió a aumentar a medida que el tamaño de los predios también lo hacía ($p=0,11$). Por otro lado, la prevalencia intra predial tuvo una amplitud de variación entre 0 y 53,3 % (mediana 23,1 %). Con este estudio se concluyó que, si bien la seroprevalencia individual se ha mantenido estable con los años, hay una alta difusión del agente en los rebaños lecheros del país. Éstos datos podrán ser utilizados para identificar posibles factores de riesgo o protección asociados a altas seroprevalencias en nuestras condiciones productivas, de forma de colaborar en el diseño de nuevas medidas para el control.

Palabras claves: estudio epidemiológico, prevalencia de Neospora caninum, enfermedades reproductivas, lechería.

SUMMARY

Neosporosis is responsible for large economic losses in cattle worldwide, since it is one of the most important causes of abortion. The last seroprevalence study conducted in Uruguay dates more than ten years ago, and it is recognizable that the productive system of this country has been changed. Therefore, the objective of this study was to determine the seroprevalence and distribution of *Neospora caninum* (*N. caninum*) in dairy cattle in Uruguay. In the second semester of 2015, a cross-sectional study was developed with a two steps random sample: in the first step dairy herds were divided into three strata according to the bovine population size (from 1 to 50, 51 to 250 and more than 250 cattle). In the second step, 60 dairy cows

were sampled within each herd. A total of 4223 serum samples from 102 herds were analyzing by indirect ELISA test (ID Vet, Grabels, France), under the manufacturer's recommendations. Sampling design was used to estimate population prevalence. Dairy cow seroprevalence of *N. caninum* was $22.3 \pm 1.8 \%$ (95% confidence interval (CI), 18.7-25.9 %), and at herd level was $96.0 \pm 1.9 \%$ (95% CI, 92.1-99.8%). Herd sero-prevalence tended to increased when the size of the herd increased ($p=0.11$). In addition, intra-herd seroprevalence was calculated, having a range between 0 and 53.3% (median of 23.1%). These results show that although the individual seroprevalence has remained stable over the years, infection with *N. caninum* is widespread in Uruguayan dairy cattle. These data can be useful for further studies to identify potential risk factors associated with high seroprevalence in our productive conditions, in order to collaborate in the design of new control measures.

Key words: epidemiological study, prevalence of Neospora caninum, reproductive disease, dairy.

INTRODUCCIÓN

La neosporosis es una enfermedad causada por un protozooario intracelular perteneciente a la familia Sarcocystidae, *Neospora caninum* (*N. caninum*) (Dubey *et al.*, 1988). Es causante de enfermedad neuromuscular neonatal en perros y aborto en ganado bovino, también puede afectar a ovinos, equinos, caprinos y cérvidos. El hospedero definitivo de este protozooario es el perro, pero la transmisión no se da sólo de forma horizontal (perro-bovino) sino que también se ha descrito la presencia de transmisión vertical durante la gestación en bovinos, la cual se da con mayor frecuencia (Dubey, 2003).

Las pérdidas productivas ocasionadas por la enfermedad radican principalmente en la ocurrencia de abortos. Otras pérdidas incluyen la posible disminución de la producción de leche en vacas seropositivas (Thurmond y Hietala, 1997; Hernández *et al.*, 2001; Hobson *et al.*, 2002) y aumento de las tasas de refugo temprano (Thurmond y Hietala, 1996).

Actualmente es una enfermedad de distribución mundial, que causa grandes pérdidas económicas (Reichel *et al.*, 2013). En la región ha sido diagnosticada en Brasil (Gondim *et al.*, 1999), Argentina (Campero *et al.*, 1998), Perú (Puray *et al.*, 2006), Paraguay (Osawa *et al.*, 2002), Chile (Patitucci *et al.*, 2000), Venezuela (Lista-Alves *et al.*, 2006) y Uruguay (Cobo *et al.*, 1999). Sin embargo, el último reporte de seroprevalencia de neosporosis bovina realizado en el Uruguay fue en el año 2003, en donde para el ganado de carne fue del 14% a nivel nacional (Bañales *et al.*, 2006) mientras que para el lechero fue del 22% (Piaggio, 2006) en el sur del país. Como se observa, han pasado más de 10 años de éstos estudios y es reconocible que los sistemas productivos en el Uruguay han cambiado sustancialmente al sufrir un proceso de intensificación (DIEA y MGAP, 2016). Se ha reportado que el incremento en la densidad animal y en los niveles de estrés llevan a aumentos progresivos de seroprevalencia en los rebaños (Dubey *et al.*, 2007), de modo que la situación actual se desconoce. El objetivo de este estudio fue estimar la seroprevalencia de *Neospora*

caninum en el rebaño bovino lechero del Uruguay, tanto a nivel individual como predial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la seroprevalencia de *N. caninum* se realizó un estudio transversal. Las muestras fueron colectadas en 102 rodeos lecheros de todo el país durante el segundo semestre de 2015, por medio de un muestreo aleatorio estratificado bietápico (Figura 1). Para la selección de las muestras se utilizaron todos los bovinos del Uruguay trazados de forma individual, la que incluyó 695.811 bovinos lecheros, pertenecientes a 3.042 tambos. El marco de muestreo se integró con los predios que contaran con bovinos lecheros a muestrear (DIEA y MGAP, 2014).

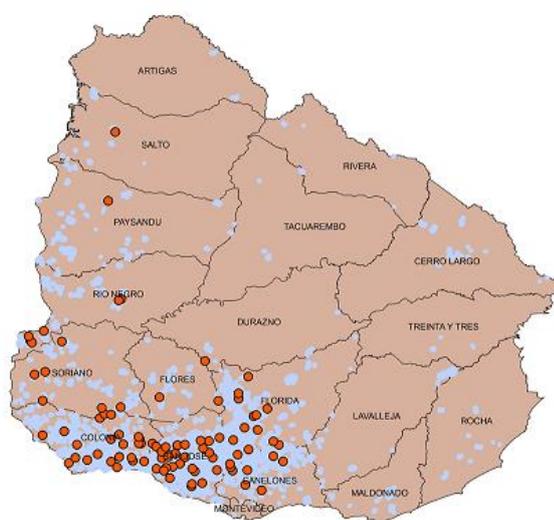


Figura 1. Mapa del Uruguay con la distribución de la totalidad de los predios lecheros. Los diferentes colores discriminan predios muestreados (●) y no muestreados (●) para el estudio de seroprevalencia de *Neospora caninum*.

Se definieron como unidades primarias de muestreo los rebaños lecheros, que fueron distribuidos en 3 estratos según el tamaño de la población bovina (Tabla I); dentro de cada estrato se seleccionó un número similar de rebaños, independientemente de la cantidad de predios que hubiera por estrato.

Ya en el establecimiento, se consideraron a las hembras bovinas adultas como las unidades secundarias del muestreo siendo seleccionadas en forma aleatoria sistemática. De esta forma se realizó la extracción de sangre de hasta 60 vacas, para estimar la seroprevalencia de *N. caninum* en cada predio. En caso de no haber suficientes bovinos de esta categoría, se tomaron el máximo de los disponibles en el momento del muestreo. Con este número de muestras, se detectan seroprevalencias que sean iguales o superiores al 5% con un 95% de confianza.

Tabla I. Distribución de bovinos, vacas adultas y predios lecheros del Uruguay según estrato de población bovina (año 2015).

Estrato ^A	Bovinos	Vacas	Predios	<i>n</i> (muestra) ^B
1 a 50 bovinos	19438	13491	626	33
51 a 250 bovinos	206447	143548	1670	36
> 250 bovinos	469926	317170	746	33
Total	695811	474209	3042	102

^A Los estratos se determinaron según la población de bovinos en cada predio.

^B Cantidad de predios seleccionados para muestrear por estratos.

El estudio de la seroprevalencia se determinó por medio de análisis de laboratorio con kits comerciales de ELISA indirecto (ID Vet, Grabels, Francia) siguiendo los protocolos del fabricante en un total de 4.223 vacas, dicho kit presenta una sensibilidad del 99,6% y una especificidad de 98,9% ($p \leq 0,05$) (Álvarez-García *et al.*, 2013).

Los análisis de resultados fueron realizados en función del diseño del muestreo, para lo cual se utilizaron las rutinas para muestreos complejos de STATA/IC 2015 (StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC). La probabilidad de selección de los rodeos y de los animales fueron considerados para ponderar los análisis y proyectar las estimaciones a la población, así como el efecto “cluster” de los establecimientos sobre los animales. Para dicho análisis se aplicó el test de χ^2 con una corrección de segundo orden (Rao y Scott, 1984) en función del diseño de la muestra. Por medio de las fórmulas propuestas por Dohoo *et al.* (2003) que se detallan a continuación, se calculó la prevalencia individual real, teniendo en cuenta las características del test de ELISA utilizado (sensibilidad y especificidad). A la vez, también se calculó la sensibilidad (HSe) y especificidad (HSp) del rebaño, en la que se considera la prevalencia, la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de la técnica diagnóstica, el *n* de animales analizados y el punto de corte en el cual un predio es considerado positivo (*k*) (en nuestro caso al menos un animal seropositivo, $k=1$) (Dohoo *et al.* 2003).

$$AP = P \times Se + (1 - P)(1 - Sp)$$

$$P = \frac{AP + Sp - 1}{Se + Sp - 1}$$

$$HSe = 1 - (1 - P)^n$$

$$HSp = \sum_0^k C_k^n (Sp)^{n-k} (1 - Sp)^k$$

RESULTADOS

La estimación de la seroprevalencia aparente en bovinos lecheros del Uruguay es del $22,3 \pm 1,8$ % (media \pm error estándar), siendo su intervalo de confianza (IC 95%) de 18,7 a 25,9 %. La prevalencia real es 21,5% (IC 95% de 17,9 a 25,2%). A nivel individual, el estrato que presentó un mayor número de bovinos infectados fue el que se conformaba por 1 a 50 bovinos, mientras que los dos estratos restantes contaron con una seroprevalencia similar (Tabla II), de todas maneras, éstas diferencias no fueron significativas.

Tabla II. Seroprevalencia individual de *Neospora caninum* según estratos de población bovina (año 2015)

Estratos	Media	Error Estándar	IC* 95%	
1 a 50 bovinos	25,2	2,6	20,0	30,4
51 a 250 bovinos	22,6	2,3	18,1	27,2
>250 bovinos	21,9	2,6	16,8	27,0

*Intervalo de confianza.

En la Figura 2 se presentan las seroprevalencias intra-prediales, en donde se observa que la mayoría de los rebaños lecheros cuentan con seroprevalencias de 10 a más de 30%. Encontrándose un bajo número de rebaños negativos. La amplitud de variación fue entre 0 y 53,3 % (mediana 23,1 %).

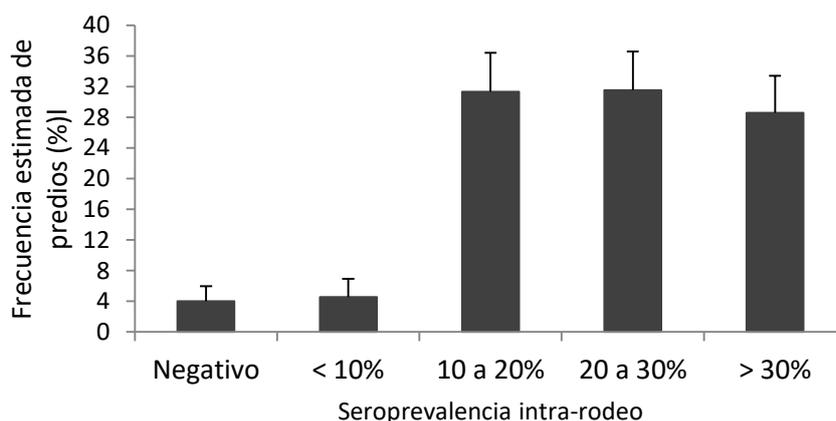


Figura 2. Distribución de predios lecheros del Uruguay según su seroprevalencia intra-rodeo de *Neospora caninum* (año 2015).

La difusión de *N. caninum* en los rebaños bovinos lecheros del Uruguay alcanzó el $96,0 \pm 1,9$ %, estando comprendido su intervalo de confianza del 95% entre 92,1 a 99,8%. La HSe es de 100% y la HSp de 51,5%. La estimación de la proporción de los rebaños con al menos una vaca

seropositiva a *N. caninum* en cada uno de los estratos, se representa en la Figura 3. En ella se observa una tendencia ($p=0,11$) al aumento de número de predios positivos a medida que el tamaño de éstos aumenta.

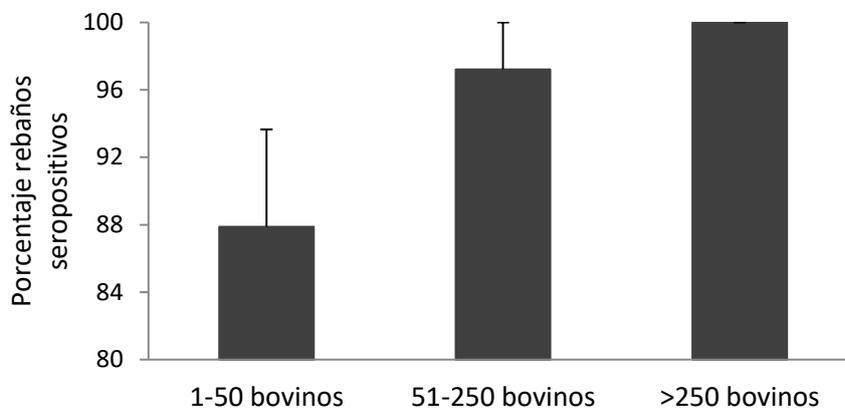


Figura 3. Difusión de *Neospora caninum* en rebaños lecheros del Uruguay según estrato de población bovina (media + error estándar) ($p=0,11$) (año 2015).

DISCUSIÓN

Si se compara la seroprevalencia actual con la reportada en el año 2003 en la principal cuenca lechera sur del Uruguay (22%; Piaggio, 2006), esta se mantuvo estable con el correr del tiempo. En ambos casos las estimaciones son de prevalencia aparente, las cuales no son muy diferentes de las reales en nuestro caso. Se observa una mayor difusión de la enfermedad en el presente estudio (96 vs. 94 %) y un aumento de los predios con seroprevalencias intra-rodeo superiores a 30%. Pero éstas leves variaciones pudieron deberse a las diferencias en el diseño, dado que en el 2003 se muestrearon un total de 84 predios lecheros en el sur del país, y de cada predio se tomaron muestras de 20 vacas, por lo que se detectaron seroprevalencias superiores a 15%, siendo el nivel de detección inferior que el del presente trabajo. Por otro lado, se considera que la detección de anticuerpos mediante la prueba ELISA ha evolucionado con el correr de los años; la sensibilidad de la prueba utilizada por Piaggio (2006) fue del 95,9%, la cual es menor a la actual pero no sustancialmente.

La alta difusión a nivel predial y la similitud con la seroprevalencia reportada en el año 2003 (Piaggio, 2006), podría indicar que *N. caninum* está presente de forma endémica en el país, y la ruta de infección vertical tiene gran importancia; dado que esta es considerada muy eficiente en el ganado bovino y la responsable de perpetuar la infección en el rebaño (Dubey *et al.*, 2006). Aún así, únicamente con la transmisión vertical la infección no se podría sostener en el rebaño ya que su eficiencia no es del 100%, es por eso que la transmisión horizontal también juega un rol clave a la hora de mantener la enfermedad en los rebaños, dado que sin esta última los niveles de infección con el tiempo tenderían a disminuir (French *et al.*, 1999). Sin

embargo, la estabilidad en la seroprevalencia ha sido asociada no sólo a la falta de medidas de control existentes (Pabón *et al.*, 2007), sino también a bajos niveles en la transmisión horizontal (Monney y Hamphill, 2014). Pudiendo concluir que en el Uruguay si bien los niveles de esta forma de transmisión son relativamente bajos, tienen importancia a la hora de mantener la enfermedad en los rebaños.

Como era de esperarse la seroprevalencia en ganado lechero fue superior a la reportada por Bañales *et al.* (2006) en el ganado carnívor, la cual fue de 14%. Éstas diferencias entre biotipos se deben generalmente a las diferencias en el manejo de los animales que varían entre sistemas intensivos y extensivos (Moore *et al.*, 2009), y no a las diferencias en susceptibilidad que presentan ambos biotipos (Dubey *et al.*, 2007).

Si bien en la seroprevalencia individual entre estratos no se observaron diferencias significativas, múltiples trabajos las han reportado (Otranto *et al.*, 2003; Portocarrero *et al.*, 2015). Una de las hipótesis planteadas es que los perros de predios de menor tamaño tienen un mayor y más fácil acceso a carcasas de bovinos, placentas y fetos abortados, favoreciendo la transmisión horizontal de *N. caninum* (Corbellini *et al.*, 2006). Por el contrario, un estudio epidemiológico llevado a cabo en Italia determinó que el riesgo de infección individual de los bovinos en un predio aumentaba cuando el tamaño del mismo también lo hacía. Los autores plantearon que esto sucedía porque a mayor tamaño de predios más número de perros eran necesario para trabajar (Otranto *et al.*, 2003).

Al dividir la prevalencia predial por estratos, se observó que el estrato conformado por predios con más de 250 bovinos tuvo la totalidad de los predios de la muestra infectados, y este porcentaje de infección tendió a disminuir a medida que disminuía el tamaño del estrato. De forma similar, Schares *et al.* (2004) afirmaron que predios con mayor número de animales eran más propensos a optar por la compra de hembras de reemplazo, haciendo que la probabilidad de infección del predio aumente, también lo asociaron a que en predios más grandes las medidas de higiene para prevenir que los perros se alimenten de material infectado son más difíciles de aplicar, contradiciendo la hipótesis planteada por Corbellini *et al.* (2006).

CONCLUSIÓN

La seroprevalencia de *N. caninum* en el rebaño bovino lechero del Uruguay se ha mantenido estable con el correr de los años, teniendo una alta difusión en gran parte de los rodeos lecheros del país, considerando entonces que *N. caninum* está presente de forma endémica. Basados en esta información es importante identificar posibles factores de riesgo o protección asociados a altas seroprevalencias en nuestras condiciones productivas, para diseñar estrategias de intervención.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarez-García G, García-Culebras A, Gutiérrez-Expósito D, Navarro-Lozano V, Pastor-Fernández I, Ortega-Mora LM (2013) Serological

- diagnosis of bovine neosporosis: a comparative study of commercially available ELISA tests. *Veterinary parasitology* 198(1): 85-95.
2. Bañales P, Fernandez L, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA, Osawa T (2006) A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Veterinary parasitology* 139(1): 15-20.
 3. Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA (1998) *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Veterinary Record* 143(8): 228-229.
 4. Cobo A, Pacheco J, Freire A, Gurgitano J (1999) 1º Diagnóstico de Aborto Bovino asociado a *Neospora caninum* en Uruguay. *Prácticas Veterinarias* 2:5-6.
 5. Corbellini LG, Smith DR, Pescador CA, Schmitz M, Correa A, Steffen DJ, Driemeier D (2006) Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Preventive veterinary medicine* 74(2-3): 130-141.
 6. DIEA y MGAP (2014) Anuario estadístico Agropecuario 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2014/Diea-Anuario%202014-Digital01.pdf> [Verificado 05 Agosto 2016].
 7. DIEA y MGAP (2016) Anuario estadístico Agropecuario 2016. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/publicaciones/anuarios-diea/anuario2016> [Verificado 30 Septiembre 2017].
 8. Dohoo IR, Martin W, Stryhn H (2003) *Veterinary epidemiologic research* (No. V413 DOHv). Charlottetown, Canada: AVC Incorporated.
 9. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla ANDA (1988) Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192(9): 1269-1285.
 10. Dubey JP (2003) Review of *Neospora caninum* and Neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology* 41(1): 1-16.
 11. Dubey JP, Buxton D, Wouda W (2006) Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of comparative pathology* 134(4): 267-289.
 12. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM (2007) Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews* 20(2): 323-367.
 13. French NP, Clancy D, Davison HC, Trees AJ (1999) Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *International Journal for Parasitology* 29(10): 1691-1704.
 14. Gondim LFP, Sartor IF, Hasegawa M, Yamane I (1999) Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology* 86(1): 71-75.

15. Hernandez J, Risco C, Donovan A (2001) Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 219:632-635.
16. Hobson JC, Duffield TF, Kelton D, Lissemore K, Hietala SK, Leslie KE, McEwen B, Cramer G, Peregrine AS (2002) *Neospora caninum* serostatus and milk production of Holstein cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221:1160 -1164.
17. Lista-Alves D, Palomares-Naveda R, García F, Obando C, Arrieta D, Hoet AE (2006) Serological evidence of *Neospora caninum* in dual-purpose cattle herds in Venezuela. *Veterinary parasitology* 136(3): 347-349.
18. Monney T, Hemphill A (2014) Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies?. *Experimental parasitology* 140: 52-70.
19. Moore DP, Pérez A, Agliano S, Brace M, Cantón G, Cano D, Leunda MR, Odeón AC, Odriozola E, Campero CM (2009) Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. *Veterinary parasitology* 161(1): 122-125.
20. Osawa T, Wastling J, Acosta L, Ortellado C, Ibarra J, Innes EA (2002) Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Veterinary parasitology* 110(1): 17-23.
21. Otranto D, Llazarí A, Testini G, Traversa D, di Regalbono AF, Badan M, Capelli G (2003) Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Veterinary parasitology* 118(1): 7-18.
22. Pabón M, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Bech-Sàbat G, Nogareda C, Almería S (2007) Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. *Veterinary parasitology* 147(1): 40-46.
23. Patitucci AN, Perez MJ, Israel KF, Rozas MA (2000) Prevalence of *Neospora caninum* in two dairy herds of the IX Region of Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria* 32: 209–214.
24. Piaggio J (2006) Estudio transversal de Neosporosis en la principal cuenca lechera del Uruguay. Tesis de la Facultad de Veterinaria, UdelaR, 73p.
25. Portocarrero C, Pinedo R, Falcón N, Chávez A (2015) Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos naturalmente infectados en la ceja de selva de Oxapampa, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 26(1): 119-126.
26. Puray NC, Chavez AV, Casas EA, Falcon PN, Casas GV (2006) Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 17: 189–194.

27. Rao JNK, Scott AJ (1984) On chi-squared tests for multiway contingency tables with cell proportions estimated from survey data. *Annals of Statistics* 12, 46-60.
28. Reichel MP, Ayanegui-Alcérreca MA, Gondim LF, Ellis JT (2013) What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—the billion dollar question. *International journal for parasitology* 43(2): 133-142.
29. Schares G, Bärwald A, Staubach C, Ziller M, Klöss D, Schroder R, Labohm R, Dräger K, Fasen W, Hess RG, Conraths FJ (2004) Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology* 129:301–309.
30. Thurmond MC, Hietala SK (1996) Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *American journal of veterinary research* 57(11), 1559-1562.
31. Thurmond MC, Hietala SK (1997) Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first -lactation dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 210:672-674.

CAPÍTULO IV: Factores asociados a la neosporosis bovina en el rebaño bovino lechero del Uruguay

RESUMEN

La neosporosis bovina es reconocida a nivel mundial por ocasionar aborto en bovinos, fundamentalmente en el segundo tercio de gestación. Estudios recientes demostraron que en Uruguay *Neospora caninum* (*N. caninum*) está presente de forma endémica; pero hasta la fecha no existe ni tratamiento ni vacuna eficaz contra este protozoario. El objetivo de este estudio fue identificar factores asociados a altos niveles de seroprevalencia de *N. caninum* en rebaños bovinos lecheros del Uruguay. Para esto se muestrearon en el segundo semestre del año 2015 ciento dos predios lecheros seleccionados de forma aleatoria estratificada de acuerdo al estrato de tamaño de población bovina (1 a 50 bovinos, 51 a 250 bovinos y más de 250 bovinos). A los productores se les realizó una encuesta y un estudio de población en donde se registró la totalidad de animales existentes en el predio; a la vez se tenía información de las entradas de bovinos del año previo en cada predio, las coordenadas geográficas, y seroprevalencia de diarrea viral bovina, leucosis bovina enzoótica y rinotraquitis infecciosa bovina. La seroprevalencia intrapredial de *N. caninum* se obtuvo de los datos reportados en el capítulo III, considerándose como predio caso a los que tuvieran seroprevalencias intraprediales superiores a 20%, y controles a los que tuvieran porcentajes menores. Con éstos datos se procedió a realizar un análisis univariado, aquellas variables con una $p \leq 0,2$ eran consideradas para ser incluidas en el modelo multivariado de regresión logística. Nueve variables fueron tenidas en cuenta para realizar el modelo multivariado, pero sólo una variable se logró mantener en el modelo. El número de perros en los predios lecheros se lo encontró asociado a los niveles de infección. Por cada perro adicional presente en el predio el riesgo de tener seroprevalencias superiores a 20% aumentaba 1,43 veces (OR=1,43; $p=0,04$), con un IC 95 de 1,02 a 2,03. Si bien este estudio demostró que la cantidad de perros en los predios lecheros aumenta el riesgo de tener altas seroprevalencias intraprediales, se considera necesario continuar por esta línea de investigación, con estudios más dirigidos, ya que éstos factores en nuestras condiciones productivas podrían tener un gran impacto reproductivo, teniendo en cuenta la gran difusión de la enfermedad en el país y la sobrepoblación de perros existentes.

Palabras clave: factor de riesgo, hospedero definitivo, lechería.

SUMMARY

Bovine neosporosis is recognized worldwide to cause abortion in cattle, mainly in the second third of gestation. Recent studies showed that in Uruguay *Neospora caninum* (*N. caninum*) is endemic; but nowadays there is no effective treatment or vaccine against this protozoan, the objective of this study was to identify factors associated with high levels of seroprevalence of

N. caninum in dairy cattle herds of Uruguay. For this, in the second semester of 2015, 102 dairy farms were selected with a two steps random sample according to the stratum of cattle population (1 to 50 cattle, 51 to 250 cattle and more than 250 cattle). A survey and a population study were carried out to the herdpersons. At the same time, the in degree data were available for the sampling previous year (July 2014 to July 2015), geographic coordinates and seroprevalence in each herd of bovine viral diarrhoea, bovine leukosis enzootia and infectious bovine rhinotracheitis. The intrapredial seroprevalence of *N. caninum* was obtained from the data reported in chapter III, considering as a case those herds who had intraherd seroprevalences higher than 20%, and controls those who had lower percentages. With these data we proceeded to perform a univariate analysis, those variables with a $p \leq 0.2$ were considered to be included in the multivariate logistic regression model. Nine variables were taken into account to perform the multivariate model, but only one variable was maintained in the model. The number of dogs in the dairy herds was found associated with infection levels, for each additional dog present in the herd the risk of having seroprevalences higher than 20% increased 1.43 times (OR = 1.43, $p = 0.04$), with an IC 95 of 1.02 to 2.03. Although this study showed that the number of dogs in the dairy farms increases the risk of having high intraherd seroprevalences, it is considered necessary to continue with this line of research, with more targeted studies. Since these factors in our productive conditions could have a great reproductive impact, taking into account the great spread of the disease in the country and the overpopulation of existing dogs.

Key words: risk factor, definitive host, dairy.

INTRODUCCIÓN

Neospora caninum (*N. caninum*) es un protozoario intracelular (Dubey *et al.*, 1988) que afecta prácticamente a cualquier especie de sangre caliente, pero se caracteriza por la ocurrencia de aborto en bovinos, los que son los principales hospederos intermediarios del protozoario (Dubey, 2003). Los perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) (McAllister *et al.*, 1998), junto con el lobo gris (*Canis lupus*) (Dubey *et al.*, 2011), el dingo (*Canis lupus dingo*) (King *et al.*, 2010) y los coyotes (*Canis latrans*) (Gondim *et al.*, 2004b) son los únicos hospederos definitivos hasta la fecha demostrados, siendo fundamentales en la epidemiología de la neosporosis bovina (Dubey y Schares, 2011).

Dado que no existe ni tratamiento ni una vacuna eficaz para el rebaño bovino (Marugan-Hernandez, 2017), es indispensable implementar correctas medidas de control y prevención para reducir y prevenir la infección en el ganado (Dubey y Schares, 2011; Marugan-Hernandez, 2017). Es por eso que múltiples estudios epidemiológicos se han realizado para determinar la existencia de factores de riesgo o protección vinculados a infecciones con *N. caninum* en bovinos. De todas maneras, éstos factores varían dependiendo los sistemas productivos, las medidas de manejo y de bioseguridad que se realizan en cada predio, la seroprevalencia intra-predial, la vía predominante de infección presente, y según el nivel en que la afección este influyendo en la performance reproductiva y productiva de los animales (Dubey *et al.*,

2007). Es esencial entonces que las estrategias de control se basen en las condiciones productivas de cada país o región.

En el año 2015 se realizó un estudio de seroprevalencia a nivel nacional en el rebaño bovino lechero del Uruguay, si bien la seroprevalencia individual no fue alta ($22,3 \pm 1,8 \%$) (Capítulo III) si se lo compara a estudios similares de la región (Moore, 2005), se encontró que el agente estaba distribuido en la mayor parte de los rebaños lecheros del país (seroprevalencia a nivel predial de $96,0 \pm 1,9 \%$) (Capítulo III). A pesar de esto, estudios previos tanto en ganado de leche (Piaggio, 2006) como de carne (Bañales *et al.*, 2006) no han logrado detectar factores asociados a la neosporosis bovina. Dada la gran variación en los niveles de infección entre los predios lecheros reportada en el 2015 (amplitud de seroprevalencia intra-predial entre 0 y 53,3%) (Capítulo III), es esperable encontrar diferencias en manejo o características generales de los predios entre aquellos con niveles de infección bajos y altos. Es por eso que el presente trabajo pretende identificar factores asociados a altos niveles de seroprevalencia de *N. caninum* en rebaños bovinos lecheros del Uruguay, que permitan conocer mejor la enfermedad y así mejorar las prácticas para su control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Base de datos

Para lograr determinar la asociación entre diferentes factores y los niveles de infección de *N. caninum* en rebaños bovinos lecheros, se utilizaron los datos reportados en el Capítulo III. En dicho estudio se muestrearon, en el segundo semestre del año 2015, 102 predios lecheros (60 vacas adultas por predio) mediante un muestreo aleatorio estratificado bietápico y se determinaron los niveles de seroprevalencia de *N. caninum* tanto a nivel individual, intrapredial como predial. Para definir los casos y controles se mantuvo el criterio utilizado por Piaggio (2006), de forma de poder hacer comparaciones entre trabajos. Se definió como caso a todos los predios cuya seroprevalencia intrapredial fuera superior o igual a 20%, siendo los controles todos los predios con niveles de infección inferiores a este porcentaje, de esta manera se contó con 40 predios controles y 62 casos.

Junto con la toma de muestra de suero en éstos predios se realizó una encuesta a los productores y un estudio de población. Además, se contó con los datos de movimientos (entradas) de bovinos del año anterior (julio 2014 a julio 2015) de cada predio, ubicación geográfica y con el diagnóstico de laboratorio de esos predios para diarrea viral bovina (DVB), leucosis bovina enzootica (LBE) y rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) de forma de poder buscar asociaciones con los factores relevados y la neosporosis bovina.

La encuesta consistió en 5 preguntas abiertas y 16 preguntas cerradas relacionadas a características generales del predio, medidas de manejo, medidas y características sanitarias, e indicadores reproductivos (Tabla III). Por otro lado, en el estudio de población se obtuvo información sobre la cantidad de bovinos, ovinos, suinos, aves de corral, caninos y cantidad de hectáreas utilizadas para la producción lechera. Con éstos últimos datos se pudo calcular la densidad animal (bovinos/hectáreas). Las variables tales

como causas de refugo de hembras, observación de ciclos largos, repetición de celos y ocurrencia de abortos en los predios se utilizaron para determinar la posible existencia de factores asociados a los niveles de infección de neosporosis, es decir, que estuvieran influenciados de alguna manera por la enfermedad.

Tabla III. Resumen de preguntas realizadas a productores de 102 predios lecheros para identificar factores asociados a altos niveles de seroprevalencia con *Neospora caninum*.

Sección	Preguntas
<i>Características generales del predio</i>	Trabajo con perros, presencia de asesoramiento veterinario, tipo de asesoramiento veterinario (eventual o permanente)
<i>Medidas de manejo</i>	Suplementación con: ración, silo, o fardo
<i>Medidas sanitarias</i>	Control sanitario y vacunación de toros, principal causa de refugo (sanitaria, dentición, primera falla o segunda falla), vacunación contra enfermedades reproductivas
<i>Características sanitarias</i>	Número de abortos vistos el año anterior, causa presumible de aborto, variación del porcentaje de aborto con respecto al año anterior, nacimiento de terneros débiles o muertos, existencia de repetición de celos o ciclos largos, antecedentes de enfermedades reproductivas
<i>Indicadores reproductivos</i>	Porcentaje de parición, duración de época de entore, número de hembras entoradas en el último entore, porcentaje de preñez.

Para las variables vinculadas a los movimientos de bovinos se tomaron en cuenta el número de entradas de bovinos totales y el número de entrada de hembras exclusivamente. De esta forma se generaron dos variables dicotómicas, dado que fueron caracterizadas en con y sin entradas de bovinos: entradas de bovinos y entradas de hembras. Aparte del número de movimientos, se contó con información del número de bovinos totales y de hembras que entraron a los predios de julio 2014 a julio 2015, en este caso permanecieron como variables continuas. Con éstos datos se generó la variable orígenes, que representa el número de lugares (dicoses físicos) al que los predios compraban sus animales.

La ubicación geográfica de cada predio se utilizó para detectar la posible existencia de conglomerados espaciales por medio del software SatScan. Para esto fue necesario contar con las coordenadas geográficas de los predios (latitud y longitud). El análisis espacial se realizó utilizando el modelo

de Bernoulli, manteniendo el mismo criterio en la clasificación de predios casos y controles.

La detección de anticuerpo para DVB, IBR y LBE se realizó mediante kits comerciales de ELISA indirecto (ID Vet, Grabels, Francia) siguiendo los protocolos del fabricante. Para éstas enfermedades se analizaron un total de 15 vacas adultas por predio, detectando seroprevalencias superiores o iguales 18% con un 95% de confianza. Para controlar el potencial factor de confusión a nivel predial de éstas variables en el análisis se las dicotomizó, clasificando al predio como positivo cuando tenía al menos un animal positivo a la prueba diagnóstica para cada enfermedad en cuestión.

Análisis estadístico:

El análisis estadístico se realizó teniendo en cuenta el diseño del muestreo, a través de las rutinas para muestreos complejos del software estadístico STATA/IC 15 (StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC). El nivel de asociación entre la variable dependiente (predio caso o control) e independiente (datos de los predios), se estimó mediante un análisis univariado, el que consistió en un test de χ^2 para el caso en que la variable independiente fuera dicotómicas, y regresión logística en caso de variables continuas. Aquellas covariables con valores de $p \leq 0,2$ en el análisis univariado, fueron tenidas en cuenta para incluirlas en el modelo multivariado de regresión logística.

Previo a la inclusión en el modelo multivariado se evaluó la relación de las variables a incluir por medio del coeficiente de correlación de Spearman, de forma de evitar problemas de colinearidad. Si dos variables estaban correlacionadas (coeficiente $>0,7$) se mantenía en el análisis aquella que tuviera mayor relación con la variable de respuesta. Luego de chequear la colinearidad se comenzó con la construcción del modelo, la selección de las variables independientes se realizó de forma manual por el método forward, las variables se agregaban de acuerdo a la significancia del valor de p de la prueba de Wald ajustada. Dado que una sola variable se mantuvo en el modelo, no fue necesario testear posibles interacciones.

Un segundo análisis univariado se realizó para intentar identificar factores que se vean influenciados por altas seroprevalencias de *N. caninum*. Para esto, se utilizó como variable de respuesta indicadores reproductivos, principales causas de refugio de hembras, observación de ciclos largos, de repetición de celos y ocurrencia de abortos; y como variable independiente los predios casos y controles. En caso que la variable de respuesta fuera dicotómica se realizó regresión logística, y en los casos en que la variable fuera continua se aplicó la regresión lineal (prueba- t). Se consideraba que las variables estaban asociadas cuando $p \leq 0,05$.

Por otro lado, se optó por buscar asociaciones entre las variables vinculadas a los movimientos y la suplementación de los bovinos, con el tamaño de los predios (estratos). Para esto se realizó el test de χ^2 para el caso de variables categóricas y regresión lineal para el caso de las continuas.

Por último, se realizó un análisis a nivel animal para buscar asociación entre infecciones por *N. caninum* y las otras enfermedades analizadas (DVB, IBR y LBE); aplicándose una regresión logística. Para este caso, se realizó el

análisis sólo en los animales con los que se contaba con el dato de seropositividad para las cuatro enfermedades, que como bien se mencionó eran 15 animales por predio. Se estimó la seroprevalencia individual de cada una de las enfermedades virales en función del diseño del muestreo, para lo cual se utilizaron las rutinas para muestreos complejos de STATA/IC 2015 (StataCorp. 2017. Stata Statistical Software: Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC). La probabilidad de selección de los rodeos y de los animales fueron considerados para ponderar los análisis y proyectar las estimaciones a la población.

RESULTADOS

Características de los predios

Los 102 predios lecheros fueron seleccionados de forma aleatoria estratificada en todo el territorio uruguayo. Los estratos fueron definidos por el tamaño de la población bovina, que tuvo una amplitud de 1 a 1179 vacas (media $130,7 \pm 171,2$). La media de vacas adultas dentro de cada estrato fue para el caso del estrato de 1 a 50 bovinos $23,7 \pm 14,6$, para el de 51 a 250 bovinos $70,4 \pm 37,3$, y para el estrato con más de 250 bovinos $303,5 \pm 209,9$. El 93,6% de la población bovina en los predios lecheros fue de raza Holstein.

En los períodos comprendidos entre julio 2014 a julio 2015, el 33,3% de los predios no realizaron entradas de animales. Por otro lado, lo que refiere a las hembras, el 45,9% de los tambos no contó con hembras de reemplazo provenientes de otros predios; en ninguno de los casos hubo diferencias significativas entre estratos. La media de hembras ingresadas anualmente fue de $14,4 \pm 3,4$, habiendo diferencias entre estratos, los predios con menos de 50 bovinos ingresaron menor cantidad de hembras durante el período de estudio que aquellos con más de 51 bovinos ($p < 0,01$) (Figura 4). Éstos tambos compraron sus hembras de $1,5 \pm 0,2$ orígenes distintos, siendo que aquellos con más de 250 bovinos compraban de 1,4 lugares más que los tambos más pequeños (1 a 50 bovinos) ($p = 0,04$).

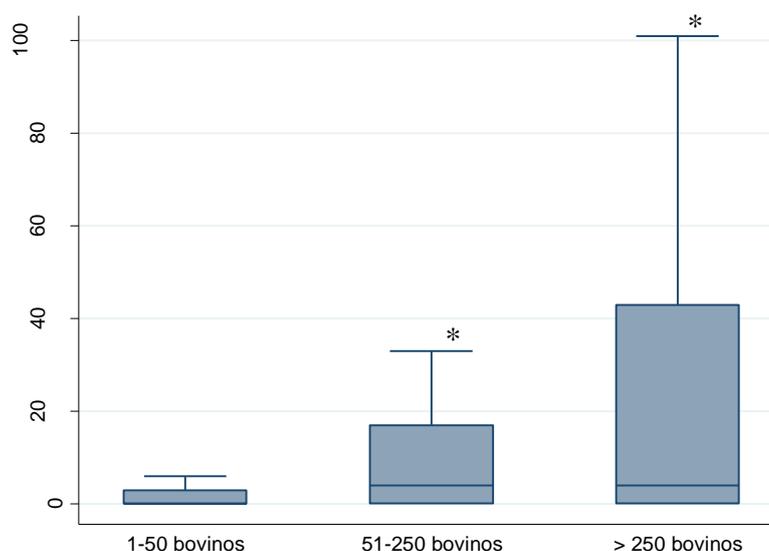


Figura 4. Número de hembras que ingresan anualmente a los predios lecheros de acuerdo al estrato de población bovina ($p < 0,01$).

*Indica falta de diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

El 87,7% de los predios lecheros suplementaban con silo o ración, mientras que el fardo era utilizado por el 73,9% de los productores, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre los estratos. En cuanto a los perros, el 94% de los tambos cuenta con al menos un perro, con un valor mínimo de uno y un máximo de diez perros. La media fue de $2,6 \pm 0,2$, teniendo el 49% uno o dos perros mientras que el 51% restante de los predios con perro tenían tres o más perros.

En cuanto al análisis espacial no se detectó la existencia de conglomerados espaciales. No habiendo asociación entre la ubicación geográfica de los predios lecheros y altos niveles de infección con *N. caninum*.

Identificación de factores asociados a altos niveles de infección con *N. caninum*

En el análisis univariado nueve variables tuvieron una $p \leq 0,2$ (Tabla IV). Se observó una colinearidad entre las variables número de perros y tres o más perros dentro del predio, siendo el coeficiente de correlación de Spearman 0,89; se optó por dejar en el modelo el número de perros, ya que aporta más información. En el modelo multivariado de regresión logística se logró incluir una única variable; reportándose que por cada perro adicional presente en el predio el riesgo de tener seroprevalencias superiores a 20% aumentaba 1,43 veces (OR=1,43; $p=0,04$), con un IC 95 de 1,02 a 2,03.

Tabla IV. Variables con $p \leq 0,2$ en el análisis univariado que fueron tenidas en cuenta para introducir en el análisis multivariado.

VARIABLES	Tipo	valor-p	n*
<i>Trabaja con perros</i>	Dicotómica	0,14	96
<i>Tres o más perros</i>	Dicotómica	0,05	82
<i>Número de perros</i>	Cuantitativa discreta	0,04	82
<i>Suplementación con ración</i>	Dicotómica	0,21	96
<i>Aborto por causas nutricionales</i>	Dicotómica	0,18	67
<i>Antecedentes de IBR en el predio</i>	Dicotómica	0,16	52
<i>Predio positivo a DVB</i>	Dicotómica	0,09	101
<i>Evaluación de la condición sanitaria de los toros previo al entore</i>	Dicotómica	0,04	52
<i>Vacunación contra IBR</i>	Dicotómica	0,11	90

*n indica cantidad de predios con los que se contaba con la información

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre predios con más de 20% de seroprevalencia intrapredial y aquellos que utilizan la segunda falla reproductiva de las hembras como principal motivo de descarte ($p < 0,01$); viéndose que esos predios con niveles altos de seroprevalencia es 5,32 veces más frecuente que refugan por este motivo

(OR= 5,32; 1,55 – 18,2, IC 95%) que predios con seroprevalencias intraprediales más bajas.

No se encontró asociación estadística entre animales infectados con *N. caninum* e infecciones por otras enfermedades virales tales como DVB, IBR y LBE. La prevalencia estimada a nivel animal fue de 80,9± 3,1%, 75,5 ± 2,9 %, y 80,1± 2,4 % para DVB, IBR y LBE respectivamente.

DISCUSIÓN

En este estudio el único factor asociado que se reportó fue el número de perros en los predios lecheros, a mayor cantidad de perros mayor el riesgo de tener niveles altos de infección (más de 20% de seroprevalencia intrapredial). Es bien sabido que los perros son los únicos hospederos definitivos demostrados en América Latina, jugando un papel clave en la epidemiología de la neosporosis bovina al ser los principales diseminadores de la enfermedad por medio de la transmisión horizontal (Dubey *et al.*, 2007).

Dado que muy pocos predios no contaban con perros, no se logró determinar como potencial factor de riesgo la presencia de perros en el predio, coincidiendo con varios investigadores (Otranto *et al.*, 2003; Schares *et al.*, 2004; Hobson *et al.*, 2005; Portocarrero *et al.*, 2005; Corbellini *et al.*, 2006) que si bien encontraron asociación con el número de éstos no pudieron reportar diferencias entre presencia y ausencia de esta especie. Un factor importante a tener en cuenta en éstos sistemas productivos es la libre circulación de los perros, tanto en el tambo como en los vecinos (Corbellini *et al.*, 2006), lo que explica por qué muchos predios sin perros están infectados (Guimaraes *et al.*, 2004). Los perros infectados con *N. caninum* pueden liberar en promedio 160.700 ooquistes a través de las heces, siendo suficiente para provocar la infección en los bovinos (Gondim *et al.*, 2002). La alta densidad de perros en los predios y los alrededores (Cotryba, 2017), así como su libre circulación son factores importantes (Scharés *et al.*, 2004) que pudieron promover la alta difusión reportada en el Capítulo III (96,0%).

De todas maneras, otros estudios sí lograron determinar la presencia de perros en los predios lecheros como potencial factor de riesgo. Un trabajo realizado por Bartels *et al.* (1999) estimaron un OR de 5,18 para este factor; cabe destacar que este fue un estudio de casos y controles, en donde los casos eran predios lecheros con antecedentes de tormentas de aborto. Esta diferencia importante entre nuestra investigación y la realizada en el año 1999, pudo contribuir a las desigualdades encontradas, junto con el hecho de que en dicho trabajo el 17% de los predios controles y el 2,1% de los casos no contaban con perros. De forma similar, un trabajo realizado en Brasil reportó que vacas que convivían con perros era 2,22 veces más probable que estuvieran infectadas con *N. caninum* (Fávero *et al.*, 2017). La principal diferencia con nuestro trabajo en este caso fue el análisis estadístico realizado, ya que éstos autores realizaron el análisis a nivel animal y en nuestro caso fue a nivel predial.

A pesar que en el análisis univariado nueve variables tuvieron valores de $p \leq 0,2$, no se logró incluir ninguna otra variable en el modelo multivariado. Un

factor importante a destacar es la cantidad de valores faltantes en algunas de éstas variables, lo que dificultaba la inclusión en el modelo al disminuir notoriamente el n de la muestra utilizada.

El no detectar conglomerados espaciales en este estudio era de esperarse, dado que es una enfermedad que no se transmite por contacto directo entre bovinos (Goodswen *et al.*, 2013) lo que llevaría a que fuera más prevalente en una zona que en otra. Teniendo en cuenta que la transmisión vertical es la vía más importante (Dubey *et al.*, 2006), se podría decir que la neosporosis en bovinos es de lenta difusión ya que se debe esperar al nacimiento de la próxima generación para que la enfermedad se transmita. Por otro lado, la transmisión horizontal que sería la principal responsable de diseminar a otros predios el protozoario es considerada baja (Dubey *et al.*, 2007) y, a la vez, los perros están ampliamente difundidos en todo el territorio uruguayo (Cotryba, 2017).

Si bien el movimiento de bovinos en los predios no se logró asociar con los niveles de infección, es un factor importante a tener en cuenta. Por un lado, se ha demostrado como potencial factor de riesgo la cría de las propias vaquillonas para el reemplazo en aquellos predios en que la infección es endémica (Barling *et al.*, 2001) y los niveles de seroprevalencia intrapredial es muy alta (Monney y Hemphill, 2014). Tal como se reportó, el 45,9 % de los predios no introdujeron hembras de reemplazo el año previo al estudio, pudiendo llevar a que los niveles de infección se mantuvieran en aquellos con niveles de seroprevalencia intrapredial más altos, dado que este tipo de manejo impide la introducción de posibles hembras seronegativas que llevarían al descenso de la seroprevalencia intrapredial (Dubey *et al.*, 2007; Schares *et al.*, 2004). Por el otro, se registró que los predios con más de 50 bovinos introducen más cantidad de hembras anualmente que los predios con menos de 50 bovinos, y de un mayor número de lugares (dicoses físicos), haciendo que su probabilidad de convertirse en un predio infectado aumente, éstos datos pueden estar asociados a las diferencias en las seroprevalencias prediales entre estratos reportadas en el Capítulo III.

Varias investigaciones han arrojado evidencia de que la neosporosis bovina es causante de problemas reproductivos en predios infectados (Hall *et al.*, 2005; Vanleeuwen *et al.*, 2010; Fávero *et al.*, 2017; Martínez *et al.*, 2017). En un estudio realizado en Brasil se observó que aquellas vacas seropositivas tenían un 25% más de probabilidad de ocurrencia de problemas reproductivos tales como metritis, abortos y/o mortalidad neonatal (Fávero *et al.*, 2017). De forma similar, Martínez *et al.* (2017) reportaron que vacas seropositivas tenían 6,63 veces más de probabilidad de tener antecedentes de historia de aborto. En este trabajo se logró asociar los altos niveles de *N. caninum* a predios cuyo principal motivo de descarte fuera por segunda falla reproductiva, lo que podría asociarse a un problema persistente. La ocurrencia de reiterados problemas reproductivos en una vaca o en un predio, podría indicar que la neosporosis está presente de forma endémica, teniendo muchos animales infectados de forma crónica (Williams *et al.*, 2009).

Neospora caninum es considerado un patógeno primario, pero existen enfermedades inmunosupresoras que pueden favorecer la infección por este

protozooario e incluso la ocurrencia de abortos en vacas seropositivas (Dubey y Schares, 2011). Las de mayor ocurrencia a nivel de rodeo son IBR (Dubey *et al.*, 2007), DVB (Dubey *et al.*, 2007; Duong *et al.*, 2008) y LBE (VanLeeuwen *et al.*, 2010). A pesar de que en este estudio no se encontró asociación con co-infecciones, otros autores si las han encontrados, por ejemplo, VanLeeuwen *et al.* (2010) reportaron a través de una regresión logística a nivel animal que vacas seropositivas a LBE eran 1,5 veces más probable de que fueran seropositivas a *N. caninum*, éstos investigadores también contaban con el dato de seropositividad de DVB y *Mycobacterium avium* subespecies paratuberculosis (MAP) a nivel individual, pero sólo se logró mantener en el modelo multivariado la LBE. Un factor importante a tener en cuenta en nuestro estudio es la alta seroprevalencia de los animales, y por ende, el bajo número de animales seronegativos a infecciones virales, lo que pudo haber influenciado en el análisis al haber pocos controles.

Si bien no se encontró asociación con la suplementación de ración, silo o fardo y los niveles de infección en los predios, se puede observar que es una práctica muy utilizada por los productores, al formar parte del proceso de intensificación y mejoramiento de los índices productivos. Esta medida, si bien es necesaria, debe ser utilizada teniendo en cuenta las correctas medidas de higiene y bioseguridad, ya que el acceso de los perros al alimento, tanto en el lugar de almacenamiento como en el potrero una vez distribuido, favorecería la transmisión horizontal de la enfermedad (Dubey *et al.*, 2007).

CONCLUSIÓN

La identificación de potenciales factores de riesgo es fundamental para implementar correctas medidas de control y prevención. Si bien este estudio demostró que la cantidad de perros en los predios lecheros aumenta el riesgo de tener altas seroprevalencias intraprediales, se considera necesario continuar por esta línea de investigación, con estudios con mayor poder para detectar asociaciones y con diseños más específicos, ya que éstos factores en nuestras condiciones productivas podrían tener un gran impacto reproductivo, teniendo en cuenta la gran difusión de la enfermedad en el país y la sobrepoblación de perros existentes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bañales P, Fernandez L, Repiso MV, Gil A, Dargatz DA, Osawa T. (2006). A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Veterinary parasitology* 139(1): 15-20.
2. Barling KS, McNeill JW, Paschal JC, McCollum III FT, Craig TM, Adams LG, Thompson JA. (2001). Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Preventive Veterinary Medicine* 52(1): 53-61.

3. Bartels CJM, Wouda W, Schukken YH. (1999). Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52(2): 247-257.
4. Corbellini LG, Smith DR, Pescador CA, Schmitz M, Correa A, Steffen DJ, Driemeier D. (2006). Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Preventive veterinary medicine* 74(2-3): 130-141.
5. Cotryba. (2017). Estudio Cuantificación y caracterización de la población canina de Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/comision-de-tenencia-responsable-y-bienestar-animal/institucional/informes-de-cotryba/estudio-sobre-poblacion-canina> [Verificado 27 Julio 2018].
6. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla ANDA. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 192(9): 1269-1285.
7. Dubey JP. (2003). Review of *Neospora caninum* and Neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology* 41(1): 1-16.
8. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of comparative pathology* 134(4): 267-289.
9. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews* 20(2): 323-367.
10. Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, Kwok OCH, Choudhary S. (2011). Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology* 181(2-4): 382-387.
11. Dubey JP, Schares G. (2011). Neosporosis in animals—the last five years. *Veterinary parasitology* 180(1-2): 90-108.
12. Duong MC, Alenius S, Huong LTT, Björkman C. (2008). Prevalence of *Neospora caninum* and bovine viral diarrhoea virus in dairy cows in Southern Vietnam. *The Veterinary Journal* 175(3): 390-394.
13. Fávero JF, Da Silva AS, Campigotto G, Machado G, de Barros LD, Garcia JL, Vogel FF, Mendes RE, Stefani LM. (2017). Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. *Microbial pathogenesis* 110: 202-207.
14. Gondim LFP, Gao L, McAllister MM. (2002). Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *Journal of Parasitology* 88(6): 1159-1163.
15. Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. (2004)b. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 34(2): 159-161.
16. Goodswen SJ, Kennedy PJ, Ellis JT. (2013). A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: from the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution* 13: 133-150.

17. Guimaraes JS, Souza SLP, Bergamaschi DP, Gennari SM. (2004) Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Paraná state, Brazil. *Veterinary Parasitology* 124(1): 1-8.
18. Hall CA, Reichel MP, Ellis JT. (2005). *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Veterinary parasitology* 128(3-4): 231-241.
19. Hobson JC, Duffield TF, Kelton D, Lissemore K, Hietala SK, Leslie KE, McEwen B, Peregrine AS. (2005). Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Veterinary parasitology* 127(3-4): 177-188.
20. King JS, Šlapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA. (2010). Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 40(8): 945-950.
21. Martinez BAF, Leotti VB, Borba MR, e Silva GDS, Corbellini LG. (2017). Can hierarchical modeling improve our understanding of bovine abortion due to *Neospora caninum* infection?. *Veterinary parasitology* 237: 77-82.
22. Marugan-Hernandez V. (2017). *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. *Journal of comparative pathology* 157(2): 193-200.
23. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. (1998). Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International journal for parasitology* 28(9): 1473-1479.
24. Monney T, Hemphill A. (2014). Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies?. *Experimental parasitology* 140: 52-70.
25. Moore DP. (2005). Neosporosis in South America. *Veterinary parasitology* 127(2): 87-97.
26. Otranto D, Llazari A, Testini G, Traversa D, di Regalbono AF, Badan M, Capelli G. (2003). Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Veterinary parasitology* 118(1): 7-18.
27. Piaggio J. (2006). Estudio transversal de Neosporosis en la principal cuenca lechera del Uruguay. Tesis maestría, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.
28. Portocarrero C, Pinedo R, Falcón N, Chávez A. (2015). Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos naturalmente infectados en la ceja de selva de Oxapampa, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 26(1): 119-126.
29. Rinaldi L, Pacelli F, Lovane G, Pagnini U, Veneziano V, Fusco G, Cringoli G. (2007). Survey of *Neospora caninum* and bovine herpes virus 1 coinfection in cattle. *Parasitology research* 100(2): 359-364.

30. Schares G, Bärwald A, Staubach C, Ziller M, Klöss D, Schroder R, Labohm R, Dräger K, Fasen W, Hess RG, Conraths FJ. (2004). Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology* 129:301–309.
31. Vanleeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Scott HM. (2010). Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Preventive veterinary medicine* 93(2-3): 129-138.
32. Williams DJL, Hartley CS, Björkman C, Trees AJ. (2009). Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*—how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology* 136(14): 1895-1900.

CONCLUSIONES GENERALES

Si bien *N. caninum* ha demostrado mantenerse estable en la población de bovinos lecheros con el correr de los años, la difusión del agente sigue siendo muy importante. El haber encontrado asociación estadística entre el número de perros presentes en los predios lecheros y niveles altos de infección podría significar que esta especie fuera la responsable de mantener y difundir las infecciones en los rodeos, lo que refleja la similitud con la seroprevalencia reportada hace más de diez años.

El observar una tendencia al aumento de la seroprevalencia predial cuando el tamaño del rodeo aumenta permite de cierto modo afirmar que a mayor tamaño del rodeo, mayor es la probabilidad de estar infectado. Esto coincide con la asociación encontrada entre el número de hembras que ingresan al predio anualmente y el tamaño de este. Aquellos predios que ingresan una mayor cantidad de hembras bovinas tienen una mayor probabilidad de infección, dado que con la entrada de una única hembra infectada ya es suficiente para convertirse en un predio infectado. A la vez, la compra de hembras de reemplazo de diferentes orígenes podría contribuir a la mayor probabilidad de infección de los predios, siendo que predios más grandes compran bovinos de más dicosos físicos que los predios de menos de 50 bovinos.

Los predios lecheros con seroprevalencias superiores a 20% utilizan de forma más frecuente la segunda falla reproductiva de las hembras como motivo de descarte, lo que significa que existe un problema recurrente en el predio. Esto puede ser consecuencia de infecciones endémicas en esos tambos, ya que las vacas con infecciones crónicas y las que nacen infectadas son las que tienden a repetir los abortos, mientras que las infecciones agudas (que se infectan de forma horizontal) en general no vuelven a abortar luego de la primera vez.

A pesar de que este trabajo arrojó evidencia de que los perros son un importante factor a controlar para intentar reducir los niveles de infección en los predios, más estudios se deberían realizar, con un mayor número de muestras, para conocer mejor la epidemiología de la enfermedad y así elaborar medidas de control eficientes.