



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO TRANSVERSAL DE NEOSPOROSIS EN LA
PRINCIPAL CUENCA LECHERA DEL URUGUAY**

Dr. José Miguel Piaggio Mazzara

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2006**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**ESTUDIO TRANSVERSAL DE NEOSPOROSIS EN LA
PRINCIPAL CUENCA LECHERA DEL URUGUAY**

Dr. José Miguel Piaggio Mazzara

Dr. Andrés D. Gil Rodríguez; DV, MS, PhD

Director de Tesis

2006

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

Nara Amélia da Rosa Farias; MV, MSc, PhD
Instituto de Biología, Departamento de Microbiología e Parasitología
Universidad Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul - Brasil

Sergio J. Duffy; MV, MSc, PhD
Director del Instituto de Patobiología
Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas
INTA - Argentina

Perla Cabrera; DV
Profesora titular del Departamento de Parasitología Veterinaria
Facultad de Veterinaria, Universidad de la República - Uruguay

2006

AGRADECIMIENTOS

- INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) por el soporte financiero para realizar el estudio.
- CNHLCH (Comisión Nacional Honoraria de Lucha contra la Hidatidosis) por su colaboración.
- Dr. Miguel Lezama - Laboratorio Intervet Uruguay.
- Centro Médico Veterinario de Florida.
- Asociación Nacional de Productores de Leche.
- Asociación de Productores de Leche de Florida.
- Dirección de Laboratorio Veterinario Miguel C. Rubino (DILAVE - MGAP).
- A los productores que participaron en el estudio.
- A los colegas particulares que colaboraron en las actividades de campo.
- Dr. Osvaldo Mourglia por su imprescindible ayuda y dedicación.
- Al Dr. Milton McAllister y la Universidad de Illinois por el diagrama del ciclo biológico gentilmente cedido.
- Facultad de Veterinaria, al equipo del Departamento de Bioestadística y al equipo técnico que participó en tareas de campo y laboratorio por su excelente desempeño (Caco, Alejandra, Joaquín, Natalia, Nacho, Ximena y Patricia). A Deborah y Elinor.
- Alvarito y Stella por su ayuda incondicional siempre.
- Dr. Andrés Gil, por su permanente guía y el apoyo brindado.
- A Cuqui por su comprensión y ayuda, a Tomy, Nico y Achi por el tiempo familiar que vieron sacrificado.

ÍNDICE

	PÁGINA
1. ANTECEDENTES	
a. Introducción	1
b. Ciclo biológico y morfología	1
c. Transmisión	4
d. Patogenia y signos clínicos en bovinos	7
e. Diagnóstico	9
f. Epidemiología	11
g. Importancia y pérdidas económicas	19
h. Tratamiento	21
i. Prevención y Control	21
2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA	24
3. OBJETIVOS	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIONES	47
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
9. ANEXOS	
a. Cuestionario general del establecimiento	60
b. Cuestionario muestreo caninos	65
c. Formulario toma de muestras caninos	66

RESUMEN

La Neosporosis es una enfermedad extendida a nivel mundial caracterizada en muchos países como la principal causa de aborto bovino, provocando grandes pérdidas económicas. El objetivo del estudio fue describir la epidemiología de la Neosporosis en la cuenca lechera sur del Uruguay, estimando la seroprevalencia en bovinos y perros de tambo, estudiar la relación entre ambas e identificar factores asociados a la seroprevalencia bovina. Se realizó un estudio transversal en 84 establecimientos durante los años 2001 -03. Los tambos fueron seleccionados a través de veterinarios y por muestreo aleatorio estratificado por departamento. Fueron muestreadas 20 vacas por tambo, totalizando 1597 muestras. La serología se evaluó por ELISA (bovinos) e IFI (perros). Mediante cuestionario se relevaron aspectos de manejo, sanitarios, productivos, presencia de aves, roedores y zorros. Los factores fueron evaluados mediante un estudio de casos (seroprevalencia 20%) y controles y las variables continuas mediante regresión múltiple. Para el porcentaje de abortos y el número de servicio por preñez se utilizaron pruebas no-paramétricas. La seroprevalencia estimada en bovinos fue de $22\% \pm 5,2\%$ con una difusión de 92%. Los perros muestreados fueron 212, promediando $2,32 \pm 1,52$ por establecimiento, cuya seroprevalencia fue 41% y la difusión 63%. La seroprevalencia en bovinos no mostró relación con la presencia o el número de perros, ni su serología. Ninguno de los factores de manejo evaluados fue significativo. Las diferencias en producción de leche, intervalos interparto, porcentaje de abortos y número de servicios por preñez no fueron significativas. *N. caninum* está presente en la cuenca lechera sur con muy alta difusión en los rodeos. No se identificaron factores de riesgo o protección asociados a altas seroprevalencias en nuestras condiciones productivas.

SUMMARY

Neosporosis is a widespread disease all over the world, characterized as an important cause of abortion in cattle causing big economic losses. The objective of this study was to describe the epidemiology of the disease in the Uruguayan dairy region (south), to estimate the seroprevalence in dairy cattle and dogs, study the relationship between them and identify the associated factors to the seroprevalence in cattle. A cross-sectional study on 84 herds was done during the period 2001 -03. The herds were selected by practitioners and by a stratified random sampling by department. Samples of 20 cows were collected obtaining 1597 samples. Antibody detection was done by ELISA for cattle and IFI for dogs. A questioner was done to get data about management, sanitary, productive issues, and the presence of foxes, rodents and wild birds. A case-control study to evaluate the possible risk factors and a multiple regression model to the continuous variables were performed. Non parametric tests were used to estimate the percentage of abortions and number of serves. The estimated seroprevalence in cattle was $22\% \pm 5,2\%$ with a diffusion of 92%. A sample of 212 dogs were tested, with a mean of $2,32 \pm 1,52$ by farm and a prevalence of 41% with a diffusion of 61%. No relationship between dog's presence, number or serostatus with the seroprevalence in cattle was found. None of the management factors evaluated were significant in relation with the seroprevalence in cattle. There were no significant differences between milk productions, intercalving intervals, abortion rate, and number of serves. *N. caninum* is present in the south part of the country with a high diffusion in herds. It was not possible to identify risk or protection factors to high prevalence levels under Uruguayan productive system.

1. ANTECEDENTES

a. Introducción

Neospora caninum es un protozooario perteneciente a la familia Sarcocystidae, phylum Apicomplexa, estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii* que causa enfermedad neuromuscular neonatal en perros y abortos en el ganado (Dubey & Lindsay 1996b⁴⁹; Barr et al. 1997¹⁶; Lindsay et al. 2001⁹⁴) y cuya distribución es mundial (Dubey 2003b⁵⁴).

Fue reconocido por primera vez en 1984 en perros en Noruega (Bjerkås et al. 1984²²).

La descripción de *N. caninum* como un nuevo género y especie fue realizada por Dubey et al. (1988⁴⁷), y luego se actualizó su descripción por Dubey et al. (2002)⁵².

N. caninum fue reportada por primera vez como causa de abortos en vacas lecheras en 1989 en un rebaño en Nuevo México (Thilsted & Dubey 1989¹⁵⁴).

b. Ciclo biológico y morfología

Su ciclo biológico involucra 3 fases (Atkinson et al. 2000⁶), 1- fase de multiplicación rápida con formación de taquizoitos, 2- fase de multiplicación lenta con formación de bradizoitos y 3- fase sexuada con eliminación de ooquistes.

El protozooario comienza su reproducción sexuada en el tracto gastrointestinal del huésped definitivo y los ooquistes de 10-11 µm de diámetro son eliminados a través de las heces. La duración del período prepatente es de 5 a 8 días. Más de 1 millón de estos ooquistes se excretan durante el período de eliminación que puede durar semanas. En condiciones ambientales favorables pueden esporular dentro de 24 horas (Lindsay et al. 1999⁹³; Dubey 1999a⁵⁰). Una vez infectivos, los ooquistes son bastante resistentes a los efectos ambientales y pueden permanecer viables en el suelo, agua y en reservas alimenticias del ganado (Dubey & Lindsay 1996b⁴⁹).

McAllister et al. (1998b)¹⁰² encontraron ooquistes de *N. caninum* en las heces del perro. Los ooquistes encontrados fueron morfológicamente similares a los de *T. gondii*, *Hammondia hammondi* y *Hammondia heydorni*. Schares et al. (2005) encontraron ooquiste en materia fecal de perros con infección natural, que fueron más cortos y con menor relación longitud/ancho en soluciones concentradas de sucrosa, sugiriendo estas diferencias morfológicas, especialmente con *H. heydorni*, como criterio preliminar para la identificación de *N. caninum* en materia fecal de perros. Los ooquistes tienen una estructura semejante a los de *Isoospora sp.*, conteniendo 2 esporoquistes con 4 esporozoítos cada uno (Lindsay & Dubey 1993⁹¹). En otro estudio perros alimentados con cerebros de ratón que contenían quistes tisulares de *N. caninum*, excretaron ooquistes en sus heces (Lindsay et al. 2001⁹⁴). Hasta el momento se consideran hospederos definitivos al perro (McAllister et al. 1998b¹⁰²; Lindsay et al., 1999⁹³) y al coyote, hecho que se ha comprobado recientemente (Gondim et al. 2004b⁶⁵).

Los estadios entero-epitelial de *N. caninum* previos a la formación de ooquistes en el huésped definitivo son desconocidos, no siendo posible hasta el momento localizar y

describir esquizontes y gamontes dentro del tracto intestinal de los caninos (Dubey et al. 2002)⁵².

Los ooquistes contaminan praderas, alimentos o agua y de esta manera, vía ingestión, los hospederos intermediarios adquieren el parásito (Dubey 1999a⁵⁰). Después de que el huésped intermediario ingiere el ooquiste esporulado, pasan a través de la pared intestinal, ingresan al torrente sanguíneo o linfático y comienza la fase de multiplicación rápida con formación de taquizoitos, de ubicación intracelular, que miden 3 a 7 μm x 1 a 5 μm . Se localizan con preferencia en células nerviosas pero se multiplican en muchos tipos de células diferentes. Los taquizoitos penetran activamente las células y se dividen rápidamente y son capaces de cruzar la placenta para causar infecciones fetales en ganado preñado. Los taquizoitos proliferan hasta que las células del huésped se destruyen y entonces nuevamente infectan otras células vecinas (Innes et al. 2000⁸⁰).

Infecciones naturales fueron reportadas en una variedad de huéspedes intermediarios incluyendo perros, ganado, ovejas, cabras, caballos, búfalos de agua y ciervos (Dubey & Lindsay 1996b⁴⁹). Se han reportado presencia de anticuerpos contra la *N. caninum* en cánidos salvajes como los zorros británicos y dingos australianos (Barber et al. 1997¹⁰), el zorro rojo y gris, el zorro de Chiloé, camélidos y felinos (Buxton et al. 2002³⁰; Dubey 2003b⁵⁴), como también en animales marinos (Dubey et al. 2003a⁵³). Ferroglio et al. (2003)⁵⁸ en un estudio realizado en el Masai-Mara (Kenya meridional), encontró presencia de anticuerpos de *N. caninum* en cebras, oryx, búfalos africanos, gacelas Thompson, impalas, jabalís, leones, hienas y chitas.

Infecciones experimentales han sido producidas en ratones, perros, zorros, cabras, gatos, ovejas, coyotes, cerdos, gerbos, conejos y ganado (Dubey & Lindsay, 1996b⁴⁹).

Mientras el sistema inmune del hospedero comienza a responder, la replicación del protozoo se enlentece y comienza la fase de multiplicación lenta con formación de bradizoitos ubicados al interior de un quiste tisular de 100 a 107 μm de diámetro. Se localizan en el SNC incluida la retina (Dubey 1999a⁵⁰; Peters et al. 2001¹³¹; Dubey et al. 2002⁵²). Estos quistes tisulares de crecimiento lento, contienen cientos de células infectivas, y pueden mantener la infección en el hospedero intermediario de por vida.

Dijkstra et al (2001)⁴⁵ alimentaron tres perros con tejido cotiledonario de vacas seropositivas a *N. caninum*, los cuales liberaron ooquistes inmediatamente después de la primera exposición al parásito. Alimentaciones subsecuentes de placenta infectada con *N. caninum* en los mismos tres perros no resultaron en una nueva liberación de ooquistes. Este experimento mostró que la *N. caninum* puede transmitirse del ganado a los perros si éstos comen placenta infectada con el parásito. En el mismo estudio ninguno de los dos perros alimentados con calostro bovino con taquizoitos de *N. caninum* eliminaron ooquistes.

Gondim et al. (2005)⁶⁶, evaluaron la eliminación de ooquistes de *N. caninum* en perros que previamente ya lo habían hecho. Alimentaron con tejidos bovinos infectados a 5 perros que previamente habían eliminado ooquistes. Volvieron a eliminar ooquistes dos de tres perros cuya re-exposición había sido entre 18 y 20 meses luego del primer desafío. Otros dos perros fueron re-expuestos 8 meses

después de la exposición primaria no volvieron a eliminar ooquistes. Estos resultados indicarían que luego de la exposición los perros podrían ser refractarios por algunos meses. Comparando la producción de ooquistes entre cachorros y perros adultos encontraron que 12 cachorros eliminaron significativamente más ooquistes (media 166,400) comparados con 5 perros adultos (media 2,900), indicando que la edad del perro puede influenciar la producción de ooquistes.

En otro estudio ninguno de los nueve perros jóvenes de entre 2 y 4 meses de edad excretaron ooquistes, seroconvirtieron, tuvieron signos clínicos o lesiones compatibles con *N. caninum* después de ser alimentados con placenta bovina y fetos abortados infectados naturalmente por *N. caninum* (Bergeron 2001²¹).

McAllister et al. (1998a)¹⁰¹ alimentaron seis gatos con ooquistes tisulares, cerebros de ratón homogenizados, y carcaza entera homogenizada de ratones seropositivos a *N. caninum*. Ninguno de ellos eliminó ooquistes de *N. caninum*.

En los experimentos que demostraron y confirmaron al perro como huésped definitivo (McAllister et al. 1998b¹⁰²; Lindsay et al., 1999⁹³), dos perros de cinco se mantuvieron seronegativos luego de producir y eliminar ooquistes de *N. caninum*, por lo tanto, no es posible afirmar la ausencia de infección en un perro solamente basándose en los resultados de test serológicos.

Consecuentemente a los reportes de infecciones experimentales en perros (McAllister et al. 1998b¹⁰²; Dijkstra et al. 2001⁴⁵; Schares et al. 2001¹⁴⁵; Gondim et al. 2002⁶³), Schares et al. (2005)¹⁴⁷ corroboraron eliminación de ooquistes de *N. caninum* en perros infectados naturalmente. Fueron evaluadas 24,089 muestras fecales por coprología. Se observaron ooquistes entre 9 -14 µm en 47 perros y se ellos 28 muestras fueron inoculadas en gerbos, de los cuales 7 tuvieron respuesta de anticuerpos anti *N. caninum*, a su vez 5 fueron pasados con éxito a cultivos celulares. Los ooquistes de *N. caninum* fueron encontrados predominantemente entre los meses de enero y abril (invierno alemán).

Lindsay et al. (1996)⁹² inocularon tres cachorros de coyote con cerebros de ratones infectados con *N. caninum* originalmente aisladas de perros, ninguno de los cachorros desarrolló neosporosis o excretó ooquistes de *N. caninum* en sus heces, pero desarrollaron anticuerpos anti *N. caninum* > 1:800. Barling et al. (2000b)¹² reportaron a los coyotes y a los zorros grises como factores de riesgo para la seropositividad del ganado a la *N. caninum*. Mas tarde Gondim et al.(2004b)⁶⁵ alimentaron 4 cachorros de coyote con tejidos de fetos bovinos infectados con *N. caninum* y examinaron la materia fecal hasta 28 días post infección. Un coyote eliminó ooquistes demostrando que junto al perro es huésped definitivo de *N. caninum*.

Los ciervos, una presa natural de los cánidos salvajes, son susceptibles de infecciones naturales atribuibles a *N. caninum* (Barling et al. 2000b¹²; Gondim et al. 2004a⁶⁴). Estos hallazgos proveen evidencia epidemiológica de un ciclo de transmisión silvestre entre los cánidos salvajes y el ganado.

En otro experimento 4 perros fueron alimentados con tejido cerebral de venados infectados naturalmente, 2 de los perros eliminaron ooquistes. Estos ooquistes

administrados a un ternero produjeron altos títulos de anticuerpos indicando que la *N. caninum* proveniente de animales silvestres puede infectar al ganado. Además en el mismo estudio se reportaron seroprevalencias de anticuerpos de 39% para lobos grises, 11% en coyotes, 26% en venados y 13% en alces. Estos datos son consistentes con un ciclo de transmisión silvestre entre cérvidos y cánidos (Gondim et al. 2004a⁶⁴). Este ciclo en animales silvestres puede actuar como un reservorio de la *N. caninum*. En la Figura 1 se observa el diagrama del ciclo biológico con la participación de animales domésticos y silvestres de acuerdo al estado actual de conocimiento sobre el mismo.

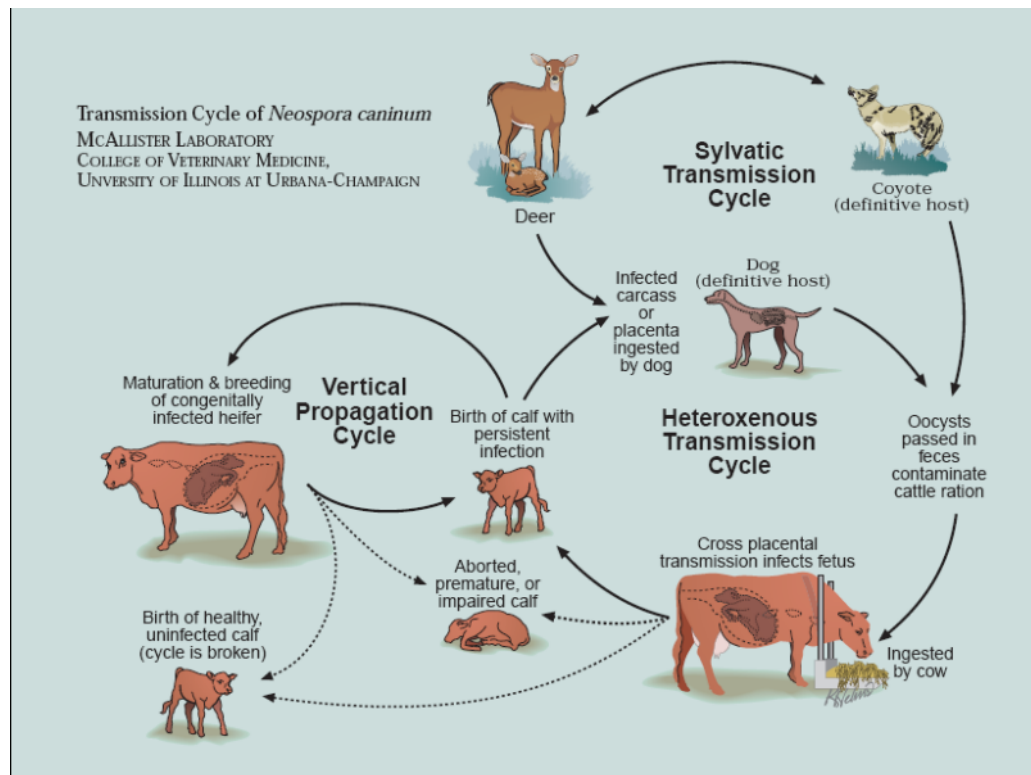


Figura 1: Ciclo Biológico de *Neospora caninum* (Cortesía del Dr. McAllister) (<http://www.cvm.uiuc.edu/faculty/attach/mmmcalli/neocycle.pdf>).

c. Transmisión

Existen dos modos de infección, infección congénita e infección post natal. Ha sido establecido que la transmisión transplacental de la *N. caninum* de vaca a ternero es la ruta más común de infección en ganado (Paré et al. 1996¹²²; Anderson et al. 1997⁴; Schares et al. 1998¹⁴³; Davison et al. 1999⁴¹; Anderson et al. 2000⁵; Maley et al. 2003⁹⁹; Piergili et al. 2003¹³⁴; Hall et al. 2005⁷¹). La eficiencia de este modo de transmisión ha sido reportada en el 81% (Paré et al. 1996¹²²), 93% (Schaes et al. 1998¹⁴³) y el 95 % (Davison et al. 1999⁴¹), basada en la presencia de anticuerpos pre-calostroales en terneros nacidos de madres seropositivas. Sin embargo Pereira -Bueno et al. (2000)¹²⁹ reportaron una eficiencia de 48% en un estudio prospectivo en España, pero los autores sugieren que la diferencia puede deberse al punto de corte utilizado para la IFAT (1:1024). La infección puede ser propagada verticalmente a

través de sucesivas generaciones (Björkman et al. 1996²³; Anderson et al. 1997⁴; Wouda et al. 1998¹⁷⁴). Generalmente se asume que el ganado puede permanecer infectado con *N. caninum* de por vida. Sin embargo, no todo el ganado infectado transmite la infección a todas sus crías que sobreviven. (Wouda et al. 1998¹⁷⁴).

La transmisión vertical ocurre porque la infección fetal frecuentemente no resulta en aborto, pudiendo quedar el ternero que sobrevive como un animal infectado persistentemente. La mayoría de los terneros infectados vía vertical nacen clínicamente sanos y sólo en un pequeño porcentaje, alrededor de 5% de las veces, ocurre muerte fetal (Williams et al. 2003¹⁷¹; Maley et al. 2003⁹⁹; Piergili 2003¹³⁴). La transmisión congénita es evidente al estudiar la distribución familiar de la serología en sucesivas generaciones (Björkman et al. 1996a²³; Paré et al. 1996¹²²; Anderson et al. 1997⁴; Schares et al. 1998¹⁴³; Hall et al. 2005⁷¹).

A pesar de la eficiencia de la transmisión vertical es evidente en el modelo teórico, que la infección *N. caninum* no puede ser sostenida en los rodeos sin una forma de infección post natal (French et al. 1999)⁶⁰. Por otra parte, estudios epidemiológicos y observaciones de campo han provisto evidencias de infección post natal de ganado con *N. caninum*. Observaciones importantes a este respecto han sido las curvas epidemiológicas de brotes de aborto asociados a *N. caninum* sugiriendo un punto de origen de exposición (McAllister et al. 1996¹⁰⁰) y la falta de asociación de seropositividad entre madres e hijas de rodeos infectados (Thurmond et al. 1997c¹⁵⁹; Mainar-Jaime et al. 1999⁹⁸). Basada en la comparación de 209 pares de madres e hijas en 43 rodeos lecheros en España, la fracción atribuible a infección congénita fue estimada en un 56 % (Mainar-Jaime et al. 1999⁹⁸). La falta de asociación entre madres e hijas seropositivas ha sido claramente demostrada en rodeos padeciendo epidemias de abortos (Thurmond et al. 1997c¹⁵⁹). Además, diferencias notables en seroprevalencia entre grupos de edad en rodeos asociados a abortos epidémicos por *N. caninum* en Holanda, indican fuertemente la existencia de infección postnatal (Wouda et al. 1999a¹⁷⁵).

La evidencia epidemiológica de infección post natal en ganado es sostenida por una demostración experimental de que los terneros pueden ser infectados oralmente con ooquistes de *N. caninum* (De Marez et al. 1999⁴⁴). Varios estudios han encontrado una baja incidencia de seroconversión en rodeos infectados endémicamente sugiriendo un nivel bajo de infección post natal (Paré et al. 1996¹²²; Paré et al. 1997¹²³; Schares et al. 1998¹⁴³; Davison et al. 1999⁴¹; Hietala & Thurmon 1999⁷⁴). Se han estimado tasa anuales sumamente bajas, 0,9% (Hietala & Thurmon 1999⁷⁴) y 1,9% (Davison et al. 1999⁴¹). Pereira-Bueno et al. (2000)¹²⁹ en un estudio transversal reportaron un 7% de animales seropositivos nacidos de vacas seronegativas, y en un estudio prospectivo tasas de infección post natales de 6,8% (1997) y 4,5% (1998). Los datos reportados por Pan et al. (2004)¹²¹ mostraron 6,7% (167/2490) de animales seropositivos cuyas madres eran seronegativas.

Se ha especulado que la transmisión lactogénica de taquizoitos o la ingestión de membranas fetales o fluidos uterinos conteniendo taquizoitos puede contribuir a la infección post natal (Scharés et al. 1998¹⁴³; Davison et al. 1999⁴¹). Los terneros pueden ser infectados con *N. caninum* por medio de desafío oral con calostro o sustitutos de leche infectado experimentalmente con taquizoitos, aun hasta una semana después de nacidos, pero no se comprobó infección cuando se les dio

placenta, leche o calostro de vacas naturalmente infectadas con *N. caninum*. Por lo tanto, transmisión horizontal de bovinos a bovinos es teóricamente posible, pero no es probable que constituya una ruta natural de transmisión de la *N. caninum* (Davison et al. 2001⁴²).

El bajo porcentaje (5%) de abortos repetidos debidos a Neosporosis (Anderson et al. 1995³), sugiere que el ganado puede desarrollar una inmunidad protectora contra los abortos inducidos por *N. caninum* (Innes et al. 2000⁸⁰; Innes et al. 2005⁸³). Existen evidencias que indican que en la mayoría de los casos en que se produce infección fetal con *N. caninum* estos no finalizan con aborto (Jenkins et al. 2002⁸⁴).

Williams et al. (2000)¹⁷⁰ infectaron vacas por inocularon intravenosa de *N. caninum* en diferentes momentos antes y durante la gestación. Cinco de seis fetos habían muerto tres semanas post infección en las vacas que estaban en el primer tercio de la gestación y se produjo reabsorción embrionaria. Los seis fetos de las vacas que se encontraban en el tercer tercio de la gestación nacieron clínicamente sanos pero congénitamente infectados. Esto indica que el momento de exposición del feto a la *N. caninum* es determinante del resultado de la gestación. Por otra parte las seis vacas inoculadas 7 semanas antes de la preñez, tuvieron terneros clínicamente sanos y sin evidencia de infección transplacentaria. Este resultado indicaría que la infección en adultos no causaría infección permanente o que una infección primaria en vacas no preñadas resulta en una respuesta inmune efectiva para prevenir la TPI. Las diferencias entre vacas con infección post natal e infección congénita pueden tener implicancias en el desarrollo de programas de control (McAllister 2001)¹⁰⁴.

Trees & Williams (2005)¹⁶³ plantearon la importancia de distinguir entre la infección transplacentaria (TPI) endógena y exógena, que describen respectivamente la infección a partir de la madre crónicamente infectada (probablemente a su vez infectada in útero) y la TPI como resultado de la infección materna durante la gestación. Estos modos de TPI tienen diferentes consecuencias epidemiológicas, inmunológicas y sobre el control. Existen evidencias que infecciones previas pueden proteger al ganado de la TPI exógena (Innes et al. 2001⁸¹; Williams et al. 2003¹⁷¹), sin embargo no hay evidencia, o no se conoce, si puede lograrse protección frente a la TPI endógena.

Kyaw et al. (2004)⁸⁸ realizaron un estudio en 4 vacas preñadas seropositivas con título previos de 1:400 y 1:1600 (IFA). Fueron confinadas y observadas hasta el parto. Todas parieron terneros clínicamente normales. Se realizó histopatología, inmunohistoquímica (IHQ) y PCR para *N. caninum* sobre tejidos de los terneros, y aislamiento en cultivos celulares de células vero. Al parto todas las vacas resultaron seronegativas a 1:200 y 2 de las 4 tuvieron títulos de 1: 100. En tres de los cuatro terneros no se encontró evidencia de infección, determinada por resultados negativos de serología pre-calostroal (1:25), histopatología, IHC y PCR. Un ternero fue congénitamente infectado, evidenciado por HIQ y PCR en muestras de cerebro, y títulos pre-calostrales de 1:100. Los autores concluyen que los títulos de anticuerpos anti *N. caninum* en vacas crónicamente infectadas pueden convertirse a un estatus negativo en el momento del parto.

d. Patogenia y signos clínicos en bovinos

El principal signo clínico de infección por *N. caninum* en el ganado es el aborto ocurrido en el tercio medio de la gestación (Anderson et al. 2000⁵). El aborto puede ocurrir desde los 3 meses de gestación hasta el término (Conrad et al. 1995³⁷), aunque es más común entre los 4 a 6 meses de gestación (Conrad et al. 1995³⁷; Anderson et al. 1995³). El aborto es el único signo clínico observado en las vacas infectadas.

Existe controversia sobre el rol patogénico de la *N. caninum* en relación con el aborto. Diagnósticos basados solamente en los resultados de histopatología fetal o inmunohistoquímica pueden llevar a una falsa implicancia de la *N. caninum* como una causa de aborto. Por otro lado, los fetos abortados infectados con *N. caninum* presentan infiltraciones celulares y áreas de necrosis en muchos tejidos (Wouda et al. 1997b¹⁷³). La severidad y la extensión de las lesiones puedan causar muerte fetal y aborto, confirmado por infección experimental en vacas preñadas. (Maley et al. 2003⁹⁹).

Los fetos pueden morir in útero, ser reabsorbidos, momificados, autolisados, ser mortinatos, nacer vivos pero enfermos, o nacer clínicamente normales pero crónicamente infectados. Lo anterior dependerá del momento en que la madre se ha infectado (Anderson et al. 2000⁵; Dubey 2003b⁵⁴), del tiempo en que se produce la reactivación de la infección crónica (Williams et al. 2003¹⁷¹), de la magnitud de la parasitemia y de las características particulares de la cepa actuante (Buxton et al. 2002³⁰; Maley et al. 2003⁹⁹). Los fetos abortados son generalmente autolíticos, sin lesiones macroscópicas considerables y el aborto no cursa con retención de placenta ni con lesiones de la misma (Lindsay & Dubey 1993⁹¹; Conrad et al. 1995³⁷). Las principales lesiones que se producen son en el SNC, donde se evidencia una encefalitis (Dubey 2003b⁵⁴) y a nivel de la placenta, donde se produce un proceso inflamatorio agudo con necrosis focal, lo cual afecta la interfase materno-fetal (Buxton et al. 2002³⁰; Maley et al. 2003⁹⁹).

Tanto el ganado de carne como el de leche son afectados. Si bien existe mayor número de reportes en ganado de leche, igualmente han sido informadas la infección congénita y el aborto producido por *Neospora* en ganado de carne (Hoar et al. 1996⁷⁵; Waldner et al. 1998¹⁶⁷; Wouda et al. 1998¹⁷⁴).

La existencia de abortos repetidos indica que la inmunidad o resistencia adquirida en las vacas infectadas naturalmente, en algunos casos, es insuficiente para prevenir la infección fetal durante las siguientes preñeces (Anderson et al. 1995³; Venturini et al. 1999)¹⁶⁵. En vacas persistentemente infectadas la transmisión transplacentaria de la infección fue asociada con un marcado aumento de los anticuerpos maternos, que puede interpretarse como una evidencia indirecta del recrudecimiento de la parasitosis (Guy et al. 2001⁷⁰).

La modulación de la respuesta inmune durante la gestación puede causar una reactivación de los bradizoitos infectados, seguida de una ruptura de quistes tisulares y un recrudecimiento de la infección (Innes et al. 2002⁸²). Debido a que *N. caninum* es un parásito intracelular obligado, la principal respuesta inmune protectora contra la infección es la mediada por células (Anderson et al. 2000⁵; Innes et al. 2002⁸²),

asociada a linfocitos T helper tipo 1, los cuales estimulan la producción de interferón (IFN γ), interleuquina 12 (IL-12) e IL-2 (Williams et al. 2003¹⁷¹; Moore et al. 2005¹¹²). Durante la gestación el aumento en la concentración de la IL-10 regula en baja la producción de IFN γ generando una disminución en este tipo de respuesta inmune entre los 4 y 6 meses de gestación, lo cual favorecería la multiplicación del parásito y por lo tanto la transmisión vertical en este período (Innes et al. 2001⁸¹; Innes et al. 2002⁸²; McAllister & Latham 2002¹⁰⁵).

Varios factores influyen el resultado de la infección en la preñez, el momento, intensidad y duración de la parasitemia durante la gestación, la efectividad de la respuesta inmune materna y la habilidad del feto de montar una efectiva respuesta inmune (Williams et al. 2000¹⁷⁰, Innes et al. 2002⁸²; Innes et al. 2005⁸³). En el segundo tercio de la gestación el feto ya es capaz de montar una respuesta inmune rudimentaria, evidenciada por la presencia de anticuerpos en el suero de fetos abortados. Esta respuesta puede no ser suficiente ya que la mayoría de los abortos ocurre en este período. Sin embargo, si la infección ocurre en el último tercio de la gestación el feto es capaz de sobrevivir y nacer infectado clínicamente sano (Williams et al. 2000¹⁷⁰ Buxton et al. 2002³⁰; Maley et al. 2003⁹⁹).

Collantes et al. (2006)³⁵ estudiaron la influencia de la etapa gestacional sobre la distribución de *N. caninum*, la carga parasitaria y las lesiones, en 220 fetos bovinos abortados. La presencia del parásito se detectó por PCR en 72 fetos. Al evaluar el tiempo de gestación encontraron una disminución en el DNA parasitario detectable en corazón e hígado. En el último tercio de la gestación solamente se detecta en cerebro y esporádicamente en diafragma, corazón y nódulos linfáticos. La carga parasitaria y la severidad de las lesiones observadas disminuyeron con el progreso de la gestación, siendo mayores en el primer y segundo trimestre. Estos resultados confirman la influencia de la edad fetal en la patogenia de la infección natural de *N. caninum*.

López-Gatius et al. (2004)⁹⁶ evaluaron serología 2773 vacas preñadas de 6 establecimientos lecheros. La media de la seroprevalencia fue de 15,1% . Se realizó un modelo de regresión logística sobre aborto antes o después del día 90 de gestación como variable dependiente, y fueron evaluados los efectos de seropositividad a *N. caninum*, rodeo, estación y partos anteriores (con partos o nulípara). El rodeo y el estatus serológico positivo a *N. caninum* no resultaron significativos sobre el aborto antes de los 90 días de preñez. El riesgo de aborto fue mayor en animales gestando en períodos calurosos que en fríos (OR=4) y en animales con partos anteriores que en los primíparas (OR=3,7). El modelo de regresión logística sobre aborto posterior a los 90 días de gestación solamente incluyó la variable de seropositividad a *N. caninum*, indicando un riesgo de aborto de 18,9 veces mayor en las vacas seropositivas. Estos resultados sugieren que la infección crónica previa a la preñez no afecta el período temprano de la gestación, mientras que tiene un efecto abortivo significativo después de los 90 días de preñez.

La asociación entre la seropositividad y la performance de crecimiento después del destete (Barling et al. 2000a¹¹) refuerza la hipótesis del recrudecimiento. Es posible que los taquizoitos de *N. caninum* sean liberados en forma intermitente durante condiciones de estrés.

En la actualidad, aún no está claro si la intensidad de los signos clínicos depende de la cepa de *Neospora* o de factores propios del hospedero (McAllister & Latham, 2002). Se ha demostrado que existen diferencias en algunos segmentos de DNA y en la tasa de crecimiento in vitro en aislamientos individuales de *N. caninum*. Estas diferencias pueden contribuir a explicar la variación de la patología encontrada en el ganado infectado con el protozoario (Schock et al. 2001¹⁴⁹).

Signos clínicos en terneros

Terneros nacidos vivos pueden presentar signos neuromusculares como resultado de la infección congénita por *Neospora*. Los signos clínicos son aparentes dentro de los primeros 3 a 5 días de vida aunque pueden aparecer más tarde, hasta 2 semanas después. Los terneros pueden nacer débiles y con bajo peso o incapacidad para aumentar de peso. Los miembros anteriores y/o los posteriores pueden aparecer hiperextendidos y pueden ser flexionados a la presión normal (Il lanes et al. 1994)⁷⁹. El examen neurológico puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar y pérdida de la propiocepción consciente (Bryan et al. 1994)²⁹. En algunos casos puede observarse exoftalmia o asimetría en los ojos (Dubey 2003b⁵⁴).

Aunque la Neosporosis congénita subclínica es probablemente común, sólo han sido informados pocos casos de Neosporosis clínica. Es probable que la mayoría de los terneros con Neosporosis clínica muera dentro de las 4 primeras semanas de vida (Dubey & Lindsay 1996b)⁴⁹. No existen reportes de síntomas clínicos en animales mayores a los 2 meses (Dubey 2003b⁵⁴).

e. Diagnóstico

Debe diferenciarse la evidencia de exposición determinada por la presencia de anticuerpos específicos, la infección del animal por el protozoario y por último el diagnóstico de *N. caninum* como causa de aborto. Una prueba seropositiva a *N. caninum* indica exposición al agente. El examen histopatológico del feto abortado permite realizar el diagnóstico de Neosporosis. Para establecer este diagnóstico, se deben considerar las lesiones características en el feto, encontrar *N. caninum* en dichas lesiones y evaluar la serología materna (Barr et al. 1997¹⁶; Anderson et al. 2000⁵; Innes et al. 2002⁸²; Dubey 2003b⁵⁴).

Histopatología e inmunohistoquímica (IHQ) en fetos .

No hay lesiones patognomónicas. El principal órgano afectado es el cerebro, cuya lesión típica es la presencia de encefalitis multifocal caracterizada por necrosis e inflamación no supurativa (Anderson et al. 2000⁵; Jenkins et al. 2002⁸⁴; Pereira-Bueno et al. 2003¹³⁰). Se puede tener un diagnóstico presuntivo de Neosporosis con tinciones de hematoxilina y eosina (H & E).

Inmunofluorescencia indirecta (IFAT)

Diferentes estudios realizados en distintas especies animales han demostrado que esta técnica presenta una muy baja reactividad cruzada con otros parásitos coccidiales. Por esto IFAT es utilizada frecuentemente como prueba serológica de referencia para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* (Lasri et al. 2004⁹⁰). Una característica de esta técnica es la de preservar la morfología del parásito y detectar antígenos de membrana, evitando reacciones cruzadas con otras coccidias (Björkman & Ugglá 1999a²⁵). También se aplica al diagnóstico en suero fetal (Barr et al. 1995)¹⁵.

Enzima inmunoensayo (ELISA)

IFAT y el ELISA son las pruebas serológicas más utilizadas para la detección de anticuerpos específicos de *N. caninum* en bovinos (Dubey 2003b⁵⁴, von Blumröder et al. 2004¹⁶⁶). Para diagnóstico en sueros individuales, la IFAT sigue siendo la prueba de elección, pero cuando el objetivo es realizar estudios seroepidemiológicos usando un gran número de muestras se realizan pruebas de ELISA (Anderson et al. 2000⁵; Lasri et al. 2004⁹⁰), que requiere de menos tiempo para su ejecución y es de menor costo. Otras aplicaciones de esta técnica son la detección de anticuerpos en leche (Björkman et al. 1998²⁴; Moore et al. 2001¹⁰⁹) y el ELISA de avididad de IgG que puede discriminar entre infecciones crónicas y recientes (Björkman et al. 1999b²⁶; Björkman et al. 2005²⁸; Aguado-Martínez et al. 2005¹).

Immunoblot (Western Blot)

Es un método muy específico y, dependiendo de los valores de corte, de alta sensibilidad al ser comparado con otros métodos (Söndgen et al. 2001¹⁵⁰). Con esta técnica se han identificado cerca de 20 antígenos inmunodominantes considerados los principales para ser detectados en pruebas diagnósticas serológicas (Atkinson et al. 2000⁶).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica altamente específica y sensible para la detección de infección fetal (Anderson et al. 2000⁵; Pereira-Bueno et al. 2003¹³⁰). Se ha observado una baja correlación entre el PCR y la histopatología (Pereira-Bueno et al. 2003¹³⁰) e Immunoblot, que podría explicarse por una muerte fetal previa a la manifestación de las lesiones características en cerebro y por la influencia de la edad y de la autólisis en la presencia y detección de anticuerpos. La detección por PCR de infección *N. caninum* en tejidos fetales resultó más sensible que la inmunohistoquímica (Baszler et al. 1999²⁰).

Aislamiento

Cultivos celulares e inoculación en ratones y cerdos pueden ser usados para recuperar *N. caninum* de tejidos (Dubey 1996b⁴⁹).

Mediante inmunohistoquímica fueron identificados taquizoitos de *N. caninum* en el 85 % de los cerebros, 14 % de los corazones, y el 26 % de los hígados de 80 fetos con Neosporosis confirmada (Wouda et al. 1997b¹⁷³). La detección inmunohistoquímica de *N. caninum* de fetos abortados o neonatos clínicamente afectados es necesaria para el diagnóstico de *N. caninum* como causa del aborto o la enfermedad clínica, pero no es suficiente para inferir que ésta sea la causa principal de aborto. A su vez, la presencia de *N. caninum* asociada a lesiones y resultados positivos de inmunoperoxidasa han sido reportados en fetos infectados experimentalmente que no abortaron y en terneros nacidos vivos. Ello ha indicado que el diagnóstico de *N. caninum* basado únicamente en histopatología e inmunohistoquímica puede no ser suficiente para el diagnóstico de *N. caninum* como la causa de aborto (Thurmond et al. 1999¹⁶⁰).

Innes et al. (2000)⁸⁰ sostienen que el diagnóstico de la enfermedad debe estar basado en la detección del parásito en tejido fetal abortado, comúnmente con inmunohistoquímica, sumado a la información adicional aportada por la serología materna. Debido a la alta eficiencia con la que la infección de *N. caninum* es verticalmente transmitida en los bovinos, la demostración de la infección en el feto no es un indicador suficiente de causa de aborto (Trees et al. 1999¹⁶²). A pesar de que

la serología fetal positiva es indicador de exposición al parásito, para la interpretación se debe tener en cuenta la serología materna (Innes et al. 2000)⁸⁰.

El hallazgo de anticuerpos específicos contra *N. caninum* en el suero fetal o en el suero precalostrado de los terneros es indicativo de infección. Por el contrario, la ausencia de anticuerpos de *N. caninum* en suero pre-calostro de fetos o terneros no implica que el feto no se haya infectado con este patógeno, debido a que la síntesis de anticuerpos en el feto depende del momento de la gestación en el cual la infección se desarrolló, el nivel de exposición y del tiempo transcurrido entre la infección y el aborto o el nacimiento (Wouda et al. 1997a¹⁷²; Söndgen et al. 2001¹⁵⁰). Otra dificultad para la detección de anticuerpos es la autólisis fetal que provoca la degradación de sus inmunoglobulinas.

La detección de anticuerpos anti *N. caninum* en el suero de las vacas que abortaron es solo indicativo de exposición a ese protozoo y no confirma que el aborto fue causado por Neosporosis. Por otro lado, una serología materna negativa es una evidencia cierta que la *N. caninum* no fue la causa de aborto.

Los títulos de anticuerpos en vacas infectadas naturalmente, pueden variar considerablemente entre animales, y pueden también fluctuar considerablemente durante toda la preñez (Stenlund et al. 1999¹⁵²), quedando ocasionalmente por debajo del cut-off de algunas pruebas (Conrad et al. 1993³⁶). A pesar de las fluctuaciones en los títulos, no hay una evidencia concluyente que demuestre que las vacas seropositivas puedan revertir a un estatus permanente seronegativo (Anderson, 2000⁵).

Las pruebas serológicas son útiles para identificar terneros infectados congénitamente si las muestras pueden ser obtenidas previamente a la ingestión de calostro.

La detección de anticuerpos en el suero de *N. caninum* indica que el animal está infectado con el parásito. Sin embargo, hasta recientemente, no era posible determinar el tiempo de inicio de la infección basándose en test serológicos. Esta situación ha cambiado con el desarrollo de un ELISA que mide la avididad de los anticuerpos a la *N. caninum*, lo que es útil para estimar la duración relativa de la infección reciente (Björkman et al. 1999b²⁶; Björkman et al. 2005²⁸; Aguado-Martínez et al. 2005¹). Este test se basa en el hecho que la fuerza de la unión del anticuerpo a los antígenos de *N. caninum* (avididad) se incrementa mucho después del inicio de la infección.

f. Epidemiología

Prevalencias

La infección con *N. caninum* es considerada de distribución mundial debido a la existencia de reportes en variadas áreas y regiones. valores que varían según la región considerada y el tipo de prueba serológica usada (Dubey 2003b⁵⁴).

Un estudio comparativo supranacional en Europa, fue recientemente reportado por Bartels et al. (2006)¹⁸. Fueron seleccionados aleatoriamente rodeos de Alemania,

Países Bajos, España y Suecia, representativos de la producción ganadera de estos países. Todos los animales mayores de 2 años fueron examinados serológicamente por una prueba de ELISA con alta especificidad (> 98,0%). En los rodeos con un solo animal reaccionante, los mismos fueron confirmados por inmunoblot. De los animales se relevaron la edad, raza, tipo de explotación, sexo, etapa de la lactancia y de los establecimientos, la región. Diferencias considerables en las estimaciones de prevalencia de *N. caninum* en rodeos, intra-rodeos y en los animales fueron observadas entre los países, las regiones, tipo de explotación, categorías de edad y las razas. Prevalencias para rodeos lecheros con al menos una vaca positiva (difusión), fueron estimadas en 16% en Suecia, 49% en Alemania, 63% en España y 76% en los Países Bajos, mientras que para rodeos de carne fueron 41% en Alemania, 46% en España y 61% en los Países Bajos. La prevalencia menor fue estimada en los ganados lecheros en Suecia (0,5%) mientras la más alta fue estimada para el ganado lechero en España (16,2%). También existieron diferencias en las distribuciones según las prevalencias intra-rodeo. La seropositividad fue asociada al tipo de explotación (carne o lechería), a la edad, a la raza y a la región dentro de países. Un estudio anterior realizado en España encontró valores de 35,9% para vacas lecheras contra 17,9% en vacas de carne (Anderson et al. 2000⁵).

En Italia Otranto et al. (2003)¹¹⁹, reportaron una seroprevalencia de 11%, que diferían entre la región sur con 8,7% y el norte con 16%.

En Portugal Canada et al. (2004)³² en un estudio sobre seroprevalencia e infección de *N. caninum* en vacas lecheras, encontraron en el grupo control (muestreo aleatorio de 114 vacas de 49 rodeos) una seroprevalencia de 28%.

Sanderson et al. (2000)¹⁴¹ realizaron en un estudio sobre seroprevalencia y factores de riesgo en 55 rodeos de producción de carne que incluyeron 2585 bovinos en el noroeste de USA. La seroprevalencia encontrada fue de 24% pero con diferencias significativas entre los Estados.

En un estudio para evaluar la susceptibilidad genética en vacas Holando en Ontario - Canadá, Pan et al. (2004)¹²¹, sobre sueros de 9.723 vacas (años 1998 a 2000) de 125 rodeos encontraron una seroprevalencia de 11,2%. Las variaciones intra-rodeo variaron entre 0% a 70%. En un estudio realizado en ganado de carne en el oeste de Canadá, sobre 1976 sueros de animales machos al momento de la entrada a 4 feed-lots adquiridos en mercados provenientes de 70 puntos de venta (British Columbia, Alberta, Saskatchewan y Manitoba) fueron encontrada una seropositividad de 6,5% (Waldner et al. 2004¹⁶⁹). En el estado de Quebec, Canadá, se han observado seroprevalencias de 50% a 60% en vacas lecheras, mientras que en Alberta, las cifras reportadas son de 9 a 13,5% en ganado de carne (Wu et al. 2002¹⁷⁸).

En Queensland (Australia central) Stoessel et al. (2003)¹⁵³ reportó una seroprevalencia en ganado de carne de 14,9%. Reichel (1998)¹³⁶ en un estudio realizado sobre 400 sueros provenientes de un banco de sueros representativos de ganado lechero de Nueva Zelanda tomados en los años 1985 y 1995, encontraron una seropositividad de 8,5% (1985) y 6,75% (1995).

Situación en Uruguay

En nuestro país el primer antecedente de exposición al agente data de un estudio realizado en perros de estancias en los cuales se encontró serología positiva mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en el 20% de los 414 perros muestreados (Barber et al. 1997¹⁰). Posteriormente fue reportada asociada a la ocurrencia de abortos en vacas Holando en el departamento de Florida mediante serología (IFI) de las vacas abortadas e inmuno-histopatología (IFD) en un feto (Cobo et al. 1999³⁴). El primer diagnóstico de neosporosis en perros y vacunos mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) y serología (IFI) en Uruguay fue realizado en 1999 (Bañales et al. 1999⁸; Bañales et al. 2000⁹) y desde entonces se realiza en forma rutinaria en la DILAVE (Dirección Laboratorio Veterinario - Ministerio de Agricultura y Pesca), encontrándose durante los años 1999 y 2000 que el 37 % de los fetos remitidos a la DILAVE fueron confirmados con infección de *N. caninum* (Easton et al. 2001⁵⁵). Un estudio seroepidemiológico en un establecimiento lechero encontró asociación significativa entre los abortos y la seropositividad de las vacas mediante IFI (Kashiwazaki et al. 2004⁸⁶). La infección fue considerada post natal debido a que el 60% de las vacas fueron positivas mientras que solamente lo fue el 20% de los terneros, sumado a la ausencia de correlación entre la seropositividad de las madres con sus crías.

Un estudio transversal realizado por DILAVE - INIA en ganado de carne encontró una seroprevalencia en ganado de carne de 13.7% \pm 1.2, y presencia en 71.2% \pm 7.0 de los establecimientos (Repiso et al. 2005¹³⁷).

Situación Regional

Moore (2005c)¹¹⁴ describió la situación epidemiológica incluyendo los trabajos realizados en bovinos y perros en Sudamérica. Hay numerosos reportes en la región sobre estudios serológicos de *N. caninum* asociada a aborto bovino, tanto en el sur de Brasil (Corbellini et al. 2002³⁸), Argentina (Campero et al. 1998³¹; Venturini et al. 1999¹⁶⁵; Moore et al. 2002¹¹⁰) y Chile (Patitucci et al. 1999¹²⁵; Patitucci et al. 2000¹²⁶), en los cuales el porcentaje de animales seropositivos en algunos casos supera el 60%.

Estudios en ganado realizado en establecimientos que no fueron seleccionados por la ocurrencia de abortos, reportan valores de seroprevalencias de anticuerpos a *N. caninum* en ganado en ganado lechero de 16,6% en Argentina (Moore et al. 2002¹¹⁰), 14,1% en Bahía-Brasil (Gondim et al. 1999⁶²), 18,4% en Minas Gerais-Brasil (Melo et al. 2004¹⁰⁷), 15% en Paraná-Brasil (Guimaraes et al. 2004⁶⁹), 12% en Paraná-Brasil (Ogawa et al. 2005¹¹⁶) y 36% en Paraguay (Osawa et al. 2002¹¹⁸). En ganado de carne 4,7% en Argentina (Moore et al. 2002¹¹⁰) y 26,6% en Paraguay (Osawa et al. 2002¹¹⁸). En estos estudios se empleó la prueba de IFAT (inmunofluorescencia indirecta) excepto en el estudio realizado en Paraguay.

Los estudios serológicos realizados en perros de áreas rurales han reportado seroprevalencias de 48% y 54,2%, para predios de producción de leche y carne respectivamente en Argentina (Basso et al. 2001¹⁹), 21% en Paraná-Brasil (Guimaraes et al. 2004⁶⁹), 21,7% en Uberlandia-Brasil (Fernandes et al. 2004⁵⁷) y 26% en Chile (Patitucci et al. 2001¹²⁷). Los valores comunicados para las áreas urbanas fueron consistentemente menores en todos los casos, 10% en San Pablo - Brasil (Gennari et al. 2002⁶¹), 10,7% en Uberlandia-Brasil (Fernandes et al. 2004⁵⁷) y 12,5% en Chile (Patitucci et al. 2001¹²⁷). Estos datos concuerdan con el reporte de prevalencia de anticuerpos de *N. caninum* mayores en perros de áreas rurales que en

perros de áreas urbanas realizados en Japón (Sawada et al. 1998¹⁴²), Corea (Kim et al. 2003⁸⁷) y México (Sánchez et al. 2003¹⁴⁰).

Un relevamiento en Perú (del Campo et al. 2003⁴³) sobre 104 perros de 23 establecimientos lecheros del valle de Lima, mostró una seroprevalencia de 32,7%, no evidenciando diferencias por sexo y edad.

Epidemiología del Aborto

Los abortos en un rodeo pueden ocurrir con patrones esporádicos, endémicos o epidémicos (Wouda et al. 1997b¹⁷³; Moen et al. 1998¹⁰⁸; Wouda et al. 1998¹⁷⁴; Wouda et al. 1999a¹⁷⁵; Anderson et al. 2000⁵). Se considera un patrón de abortos endémicos cuando la tasa de abortos es mayor al 5 % anual y que persiste por años (Anderson et al. 2000). Los abortos son considerados epidémicos cuando al menos un 10% de las vacas en riesgo aborta dentro de 6 a 8 semanas (Dubey 2003b). El aborto epidémico o tormenta de abortos, probablemente se origine por una fuente de exposición (transmisión horizontal) a partir de agua o alimentos contaminados (Yaeger et al. 1994¹⁷⁹; McAllister et al. 1996¹⁰⁰), mientras que los abortos endémicos o esporádicos persisten en un rebaño como el resultado de la propagación vertical.

Diferentes respuestas serológicas han sido reportadas entre rodeos con abortos endémicos y epidémicos asociados a *N. caninum*. Estas diferencias pueden ser atribuidas a diferentes modos de infección. Infección congénita en casos endémicos y una exposición reciente en casos epidémicos (Schaes et al. 1999¹⁴⁴). Una aplicación de un prueba ELISA-avidez mostró que todas las vacas seropositivas en un rodeo holandés, a las cuales se les extrajo una muestra de sangre inmediatamente después del comienzo de un brote de abortos asociado a *N. caninum*, tuvieron baja avidez, sugiriendo una infección reciente en el rodeo (Björkman et al. 1999²⁶).

Parecería que los abortos mas esporádicos y endémicos son el resultado de la reactivación de una infección crónica, dado que las vacas seropositivas tienen un incremento en el riesgo de aborto. Varios estudios han reportado que las vacas seropositivas a *N. caninum* tienen de 2 a 3.5 veces mayor riesgo de aborto que las seronegativas (Wouda et al. 1998¹⁷⁴; Davison et al. 1999⁴¹; Jensen et al. 1999⁸⁵; Mainar-Jaime et al. 1999⁹⁸; Stenlund et al. 1999¹⁵²). Las vaquillonas congénitamente infectadas han tenido un mayor incremento en el riesgo de aborto (7.4 veces) durante la primera preñez (Thurmond & Hietala 1997a¹⁵⁷).

En rodeos de carne Waldner (1998)¹⁶⁷ encontró que las vacas seropositivas a *N. caninum* tenían mayor riesgo de aborto (odds ratio = 5.7) o de tener un ternero débil o enfermo (odds ratio= 2.8) comparado con vacas seronegativas (419 vacas de 8 rebaños).

La infección congénita por *N. caninum* puede causar un número importante de abortos durante la primera gestación de las vaquillonas. En vacas infectadas congénitamente que abortaron previamente también pueden ocurrir abortos subsiguientes (Thurmond et al. 1997c)¹⁵⁹.

Moore et al. (2003)¹¹¹ en Argentina informaron abortos y momificación fetal. En el mismo estudio las vacas con abortos y nacimientos prematuros tuvieron mayores posibilidades de ser seropositivas que vacas normales (OR = 12).

También han sido reportadas epidemias de aborto asociadas a *N. caninum* en rodeos de alta prevalencia, posiblemente debido a la sumatoria de factores que inducen a un recrudecimiento de la infección (Wouda et al. 1999a)¹⁷⁵.

McAllister et al. (2000)¹⁰³ reportaron que durante un brote de abortos en un rodeo de carne debidos a una exposición con punto de origen de transmisión horizontal de *N. caninum*, las vacas con evidencia serológica de exposición previa a *N. caninum* tuvieron significativamente menor probabilidad de abortar o dar nacimientos prematuros, comparadas con vacas con evidencia de infección primaria. El 21% de 208 vacas abortaron (por toda causa) y el 79% fueron seropositivas a *N. caninum* el día 14 del brote. Seis vacas (3%) seroconvirtieron entre los días 14 y 85. Durante el brote, las concentraciones de anticuerpos fueron significativamente más altas en las vacas que abortaron comparadas con las vacas que no abortaron ($P > 0.001$). La concentración de anticuerpos decreció al pasar el tiempo en ambos grupos de vacas, las que abortaron y las que no abortaron. (McAllister et al. 2000)¹⁰³. En un rodeo lechero, también con una fuente de exposición, en el cual el 18% de 360 vacas abortó, resultaron seropositivas a *N. caninum* al día 18 del brote, el 100% de 79 vacas muestreadas (McAllister et al. 1996)¹⁰⁰.

Morales et al. (2001)¹¹⁵ en un estudio epidemiológico en predios lecheros en México, encontraron 72% de seroprevalencia en las vacas de 47 rodeos con altos porcentajes de aborto, mientras que en 7 predios utilizados como controles la seroprevalencia fue de 36%.

Factores de Riesgo

Teóricamente, diferentes niveles de riesgo pueden ser distinguidos en relación con la *N. caninum* en el ganado. En primer lugar el riesgo de un vaca de ser infectada con el parásito, riesgo de infección, y en segundo lugar el riesgo de un vaca infestada de abortar el feto, riesgo de aborto (Wouda et al. 2000)¹⁷⁷.

- Presencia de perros.

El perro ha sido identificado como un huésped definitivo de *N. caninum* (McAllister et al. 1998b¹⁰²; Lindsay et al. 1999⁹³), y es posible que el ganado pueda ser infectado por la ingestión de ooquistes excretados por perros (De Marez et al. 1999⁴⁴). Evidencia epidemiológica del rol del perro fue obtenida en dos estudios de casos y controles que fueron llevados a cabo antes de descubrir que fuera huésped definitivo (Paré et al. 1998¹²⁴; Bartels et al. 1999¹⁷). Ambos estudios indicaron que la presencia de perros fue el factor de riesgo más importante en el ganado. Otros estudios también han proporcionado evidencia epidemiológica que indica asociación entre el perro y la ocurrencia de abortos por *N. caninum* (Moen et al. 1998¹⁰⁸; Dijkstra et al. 2002⁴⁶). Estudios en España y Francia han encontrado asimismo asociaciones positivas entre la seropositividad de la *N. caninum* del ganado y la presencia (Ould-Amrouche et al. 1999¹²⁰) o el número de perros (Mainar-Jaime et al. 1999⁹⁸). Un estudio en Holanda (Wouda et al. 1999b¹⁷⁶) encontró que la presencia de seropositividad en el perro estaba asociada a una alta prevalencia de infección en el ganado, indicando una relación entre la infección de *N. caninum* en ambas especies. A pesar de que se ha incrementado la evidencia que el ganado puede ser infectado por la exposición a ooquistes caninos, se duda que todos los tormentos de abortos por *N. caninum* sean el resultado inmediato de una exposición reciente a ooquistes eliminados por perros. La seroprevalencia en el ganado de la mayoría de los rodeos con abortos epidémicos en Holanda fue estable en todas las categorías de edad, sugiriendo que la infección ha

sido perpetuada por transmisión vertical por algunos años previamente a la ocurrencia de las tormentas de abortos (Wouda et al. 1999a¹⁷⁵). En el estudio español, la proporción estimada de abortos atribuibles a *N. caninum* en rodeos no fue asociada al número de perros (Mainar-Jaime et al. 1999⁹⁸). Sánchez et al. (2003)¹⁴⁰ en un estudio realizado en predios lecheros de Tizayuca-México, encontraron diferencias significativas en la frecuencia de anticuerpos anti *N. caninum* en bovinos de granjas con perros (58% de 158 animales) comparada a las granjas sin perros (35% de 43 animales).

- Presencia de aves de corral

La presencia de aves de corral en las granjas también ha sido encontrada como un factor de riesgo para los tormentas de abortos asociados a *N. caninum* (Bartels et al. 1999¹⁷). Se especula que las aves de corral pueden servir como vector mecánicos de ooquistes. Otra posibilidad es que los perros adquieran la infección por comer aves infectadas. Ha sido demostrado que las palomas pueden actuar como huéspedes intermediarios después de la inoculación con taquizoitos (McGuire et al. 1999¹⁰⁶). En un estudio francés de *N. caninum*, la seropositividad del ganado fue asociada a la presencia de conejos y/o patos (Ould-Amrouche et al. 1999¹²⁰). El mismo estudio encontró una asociación negativa a la presencia de gatos.

- Alimentación en terneros con pool de calostro

Se ha demostrado que taquizoitos de *N. caninum* adicionados a la leche fueron infectivos para los terneros recién nacidos que fueron alimentados vía oral (Uggla et al. 1998¹⁶⁴). La posibilidad de una infección lactogénica, particularmente por la práctica de alimentar con pool de calostro a los terneros recién nacidos ha sido mencionada. Sin embargo, hasta ahora, no se ha encontrado evidencia de infección natural por esta ruta (Hietala & Thurmond 1999⁷⁴; Davison et al. 1999⁴¹).

- Inmunosupresión

En un estudio la alimentación con silo de maíz enmohecido apareció como un factor de riesgo (Bartels et al. 1999¹⁷). El forraje enmohecido puede contener micotoxinas, que han demostrado causar inmunosupresión. Eventos que inducen al estrés como la vacunación, la alta temperatura, factores de la dieta como desbalance en el suministro de proteínas fueron sugeridos pero esos factores no fueron significativos en el análisis (Bartels et al. 1999¹⁷).

Se ha reportado una asociación positiva entre seropositivos a *N. caninum* y seropositividad al virus de diarrea viral bovina en el ganado (Björkman et al. 2000²⁷). Esa asociación no fue encontrada por otros (Gottstein et al. 1999⁶⁷, Bartels et al. 1999¹⁷).

- Estaciones, edad, raza

La estacionalidad en la ocurrencia de tormentas de abortos de *N. caninum* ha sido observada en Holanda (Wouda et al. 1999a¹⁷⁵, Bartels et al. 1999¹⁷) y en California (Thurmond et al. 1995¹⁵⁵). En Holanda, 38 de 50 tormentas de abortos durante los años 1995 a 1997 ocurrieron el verano y otoño temprano. En California el aumento de riesgo de abortos por *N. caninum* ha sido visto durante los meses de invierno, correspondientes a clima suave y húmedo. Los factores intervinientes pueden ser sobrevivencia de ooquistes o un incremento en la exposición a factores que causan disminución e la inmunocompetencia (Thurmond et al. 1995¹⁵⁵). Thurmond & Hietala (1997a)¹⁵⁷ encontraron que el riesgo de aborto en vaquillonas infectadas congénitamente decreció para la preñez subsiguiente. Sin embargo, los autores establecen que esta observación puede haber sido sesgada por un refugio selectivo. Un estudio holandés indicó que el riesgo de aborto durante la primer y segunda

preñez en hijas nacidas de madres infectadas fue más alto que el de las madres (Moen et al. 1998¹⁰⁸; Wouda et al. 1998¹⁷⁴). En contraste, la seropositividad y el riesgo de aborto aumentaron con el número de gestación en un estudio danés (Jensen et al. 1999⁸⁵).

No se ha encontrado preferencia en la raza en los abortos asociados a *N. caninum* en un estudio incluyendo varios rodeos de razas lecheras (Jensen et al. 1999⁸⁵). Un estudio francés no encontró asociación entre la seropositividad de la *N. caninum* y la raza del ganado (Ould-Amrouche et al. 1999¹²⁰). La prevalencia de *N. caninum* fue más alta en ganado lechero que en ganado de carne en España (Quintanilla -Gozalo 1999¹³⁵). Esto puede ser relacionado con los diferentes sistemas de producción para ganado de leche y de carne y no debido a las diferencias en la raza.

En el estudio realizado por Sanderson et al. (2000)¹⁴¹ sobre seroprevalencia y factores de riesgo, no observó relación entre el estatus serológico del ganado individual con el origen (compra o propio) ni la preñez al momento de la muestra. Los animales menores de 3 años mostraron mayor seropositividad que los mayores de 6 años.

En estudio transversal llevado a cabo en Italia (Otranto et al. 2003¹¹⁹), se relevaron un total de 111 rodeos y 1140 animales. El 11% de los bovinos fueron seropositivos y 49 rodeos (44,1%) presentaron por lo menos un animal seropositivo. El mejor predictor de la seroprevalencia en este estudio fue la práctica de reemplazo de las terneras, teniendo los rodeos que crían sus propios reemplazos mayores prevalencias intra-rodeo (RO= 18,3). Un mayor riesgo fue asociado con una alta densidad de animales, mostrando la falta de pastoreo (permanente o en verano) mayores prevalencias que rodeos medianos o pequeños en los cuales los animales pastaban en forma estacional o permanente. Las granjas con dos o más perros tenían mayor seropositividad intra-rodeo que las granjas con uno o ningún perro, y este factor interactuó significativamente con el tamaño de la granja y presencia de las aves de corral. Entre las características individuales, la interacción entre preñez y prácticas de pastoreo resultó significativa, siendo mayor la seropositividad en los animales preñados a mitad de gestación (o más avanzada) que no pastaban, comparados con los animales en gestación temprana o sin gestar que estaban a pastoreo. Ningunos de los datos epidemiológicos registrados resultó ser un buen predictor del nivel del anticuerpos de *N. caninum*. No se encontró asociación con el tipo de producción (carne-leche) ni la edad (1 a 3 años- mayor de 3 años), ni el antecedente de abortos previos.

Un estudio realizado en Alemania, en el cual los rodeos fueron clasificados positivos o negativos utilizando la prueba de ELISA en el tanque de leche (los positivos probablemente tengan seroprevalencias intra-rodeo mayores o iguales a 10%) mostró que las granjas positivas reportaban tasas mayores de aborto que las granjas negativas y mayor antigüedad en tener altas tasas de abortos. Dentro de un modelo de regresión logística los factores de riesgo significativos fueron el tamaño del rodeo y factores relacionados con la localización de la granja como la densidad de los perros en la zona y la temperatura en julio (Schaes et al. 2004¹⁴⁶).

Un estudio en Suiza encontró que rodeos con títulos anticuerpos de enfermedades causantes de aborto como Leptospiras y BVDV, presumiblemente debidas a vacunación, fueron menos probables de experimentar abortos relacionados con *N.*

caninum (Hässig & Gottstein 2002)⁷². En contrate, trabajos del este de Canadá han demostrado una falta de asociación entre las prácticas de vacunación y la seroprevalencia de *N. caninum* (Chi et al. 2002)³³. El estudio canadiense, realizado sobre 2604 bovinos de 90 establecimientos lecheros en Canadá, encontró una seroprevalencia de 19,2% (Chi et al. 2002)³³. Mediante un análisis factorial fueron evaluaron 27 variables, no encontrándose ninguna asociación con la serología a *N. caninum*.

Un incremento de riesgo de exposición a *N. caninum* fue asociado con cánidos salvajes (zorros grises y coyotes) y un aumento de la densidad de ganado de carne (Barling et al. 2000b¹²).

Hobson et al.(2005)⁷⁷ en un estudio que abarcó 5080 vacas de 88 establecimientos estudió factores de riesgo asociados a la presencia de abortos por *N. caninum*. La regresión logística indicó como parámetros asociados positivamente a rodeos con aborto por *N. caninum*, la seroprevalencia intra-rodeo a *N. caninum* (OR = 1,1); el número total de perros en la granja (OR = 2,8); la frecuencia con que los perros eran observados defecando en los corrales (OR = 2,8); el número de caballos en la granja (O = 3,1); la tasa anual de retención de membranas fetales (OR = 1,2) y la tasa anual de las vacas que volvían al estro después de haber tenido preñez confirmada (OR = 1,2). Los factores protectores (asociados negativamente) fueron la frecuencia de gatos ambulantes (OR = 0,4); la frecuencia de cánidos salvajes observados en la granja (OR = 0,7) y establo de terneras con divisiones en área de alimentación, callejón de pasaje y áreas de camas (OR = 0,1).

Barling et al. (2001)¹³ estudiaron factores de riesgo asociados a seroprevalencia en terneros de carne en 76 establecimientos de Texas. 13% de los terneros fueron seropositivos a *N. caninum* y el 59% de los establecimientos tuvieron al menos un animal positivo. El nivel de seropositividad fue asociado a patrones estacionales de partos (en primavera), densidad de animales, uso de fardos redondos, reemplazos propios y el acceso de animales salvajes a los suplementos alimenticios de eng orde. El uso de alimentadores automáticos para los suplementos se asoció con una reducción del riesgo (potencialmente por disminución del riesgo de transmisión horizontal) y el uso de perros de trabajo.

Corbellini et al. (2006)³⁹ realizó un estudio transversal para estudiar la asociación entre la seroprevalencia y factores de riesgo potenciales, en 60 tambos de 2 regiones del sur de Brasil, que abarcaron 1549 animales. La seroprevalencia general fue 17,8% y el 93,3% de los rodeos tuvieron al menos 1 animal seropositivo. Se construyó un modelo multivariado de regresión logística (GEE) con la seroprevalencia como variable dependiente, en el cual finalmente quedaron 4 variables asociadas significativamente: el número de perros (OR=1,13 por cada perro adicional), la superficie (OR=0,92 por 10 ha), el empleo de pool de calostro (OR=1,79) y la región (OR=0,71).

Guimaraes et al. (2004)⁶⁹, en Paraná-Brasil, estudiaron las seroprevalencias en bovinos y perros, y analizaron factores asociados a la serología positiva en los establecimientos. Encontraron que la presencia de serología en rodeos lecheros estaba posiblemente asociada con la presencia de perros seropositivos ($r=0,47$) y con la edad de las vacas (OR=3,19 para mayores de 24 meses). Resultaron factores de

protección el empleo de silo para alimentar al ganado (OR=0,63) y la producción del concentrado en el propio establecimiento (OR=0,47).

En otro estudio realizado en Brasil, Ogawa et al. (2005)¹¹⁶ no encontraron diferencias significativas entre serología a *N. caninum* y las variables estudiadas, como el manejo de las vacas lecheras, problemas reproductivos, alimentación, presencia de perros, gatos y roedores.

Romero et al. (2002)¹³⁸ en un estudio transversal evaluaron factores asociados a la seropositividad. La prevalencia general fue de 39.7% (1191/3002), e intra -rodeo los valores fueron entre 25% y 70.5%. La edad (3-6 años, parición, la raza Jersey y falta de muestras para diagnóstico de enfermedades infecciosas abortivas fueron asociadas con sero-estatus positivo.

g. Importancia y Pérdidas Económicas

Posibilidad de Infección en Humanos

Lobato et al. (2006)⁹⁵ reportaron niveles mayores de anticuerpos en pacientes con infección de HIV (38% de seropositivos) y en pacientes con desórdenes neurológicos (18% seropositivos), comparados con controles sanos (6% seropositivos) y recién nacidos (5% de seropositivos), además de una asociación entre la seropositividad a *N. caninum* y *T. Gondii*. Los autores sostienen que estos resultados indican presencia de infección o exposición de *N. caninum* en humanos, particularmente en este tipo de pacientes, asociada como oportunista o concurrente con infección de *T. Gondii*. Previamente algunos estudios en humanos señalaron ausencia de evidencia serológica de infección con el parásito (Graham et al. 1999⁶⁸; Petersen et al. 1999¹³²; Tranas et al. 1999¹⁶¹). Sin embargo experimentalmente se había logrado infección experimental en 2 monos rhesus revelando su potencialidad zoonótica (Barr et al. 1994)¹⁴.

Omata et al. (2005)¹¹⁷ reportaron que el suero de humanos adultos no tiene efecto inhibitorio sobre el desarrollo de *N. caninum* in vitro e in vivo. En dos grupos de ratones no encontraron diferencias en el número de parásitos intracelulares entre células incubadas con suero humano e incubadas con suero fetal bovino (FBS). Tampoco hallaron efecto inhibitorio sobre la multiplicación intracelular del parásito en las células incubadas con el suero humano.

Pérdidas económicas

La importancia de la enfermedad radica en las pérdidas directas ocasionadas por los abortos. Dubey et al. (1999b)⁵¹ encontró que las pérdidas estimadas solamente por aborto para California fue de 35 millones de U\$S anuales. Otras pérdidas incluyen la posible disminución de la producción de leche en vacas seropositivas (Thurmond & Hietala 1997b)¹⁵⁸, muerte fetal temprana, mortalidad neonatal, infertilidad, alargamiento de los períodos interpartos, aumento de la tasa de refugio y reducción de los animales de reemplazo (Dubey 1999b⁵¹; Trees et al. 99¹⁶²; Hernández et al. 2001⁷³), y costos de asistencia técnica. En ganado de carne también se ha reportado disminución de la ganancia diaria (Barling et al. 2000a¹¹).

Hernández et al. (2001)⁷³ en Florida, USA, encontraron que las vacas seropositivas presentan una disminución en la producción láctea de 2,8 lb/vaca/día respecto de las seronegativas.

Se ha reportado que las vacas seropositivas a *N. caninum* producen menos leche durante su primera lactancia que las vacas seronegativas. En un estudio prospectivo en vacas Holstein en su primera lactancia, la producción láctea de las vacas seropositivas, promedió 25 litros/vaca/día y fue 1,2 litros/vaca/día menor que el promedio para las vacas seronegativas que fue de 26,2 litros/vaca/día. Esto significa unos 366 litros menos de leche por lactación (para una lactación de 305 días) (Thurmond & Hietala 1997b¹⁵⁸). El riesgo de refugo por baja producción lechera fue dos veces mayor para vacas seropositivas comparadas con las seronegativas. Otro estudio encontró que las vacas seropositivas son refugadas 6,3 meses antes y tienen 1,6 veces mayor riesgo de ser refugadas que las vacas seronegativas en el mismo rodeo (Thurmond & Hietala 1996¹⁵⁶).

La existencia de otras pérdidas distintas al aborto asociadas a la seropositividad es aún tema de controversia (Moore 2005b)¹¹³. En contraste a los reportes de disminución de la producción de leche asociados a la seropositividad, en un estudio las vacas seropositivas produjeron más leche que las seronegativas (Pfeiffer et al. 2002)¹³³. Hobson et al. (2002)⁷⁶ encontraron que la diferencia de producción entre animales seropositivos y seronegativos dependía del estatus del rodeo respecto al aborto. No observaron diferencias significativas en la producción de leche en rodeos sin problemas de aborto, aunque sí las encontraron en rodeos con abortos. Ogawa et al. (2005)¹¹⁶ no encontraron diferencias significativas entre serología a *N. caninum* y la producción de leche.

Cramer et al. (2002)⁴⁰ en un estudio retrospectivo sobre 56 rodeos y 3412 vacas lecheras concluyeron que el sero-estatus de las vacas a *N. caninum* no se encontraba asociado momento o riesgo de refugo. Por otra parte, en un rodeo sin problemas de aborto una mejor salud de la ubre fue asociada a un serostatus positivo de *N. caninum* en las vacas (Peregrine et al. 2004¹²⁸).

López-Gatius et al. (2005)⁹⁷ evaluaron 7518 inseminaciones artificiales en tres rodeos con alta incidencia de abortos por *N. caninum*. No encontraron diferencias en el % de preñez entre vacas seropositivas (32,6%) y seronegativas (34%). Los porcentajes de aborto fueron 30,1% para las vacas seropositivas y 4,2% para las seronegativas. El análisis de regresión logística indicó que el título de anticuerpos para *N. caninum*, los días de lactancia y la producción de leche no tuvieron efectos significativos sobre la fertilidad, mientras que fueron significativos la estación, número de lactancia e inseminación, el toro y el inseminador. Los autores concluyen que la infección con *N. caninum* no afecta la fertilidad en vacas lecheras de alta producción.

Signos clínicos de la enfermedad solamente han sido reportados en terneros menores de 2 meses de edad (Dubey 2003b⁵⁴). Por otra parte, en uno de dos rodeos de vacas lecheras fue encontrada una ventaja significativa en la supervivencia a los 90 días para terneras con infección congénita respecto a las no infectadas (Paré et al. 1996¹²²).

En ganado de carne los terneros seropositivos han tenido reducciones significativas en la ganancia diaria de peso vivo y del peso de carcaza en el matadero (Barling et al. 2000a¹¹). Los terneros seropositivos tuvieron una reducción de 0.05 kg de ganancia diaria (en feed lots). La seropositividad no fue asociada con enfermedad, mortalidad, o venta temprana. No obstante en otro estudio, la ganancia pre-destete de terneros de

producción de carne infectados y no infectados resultó similar (Waldner et al. 2002¹⁶⁸).

h. Tratamiento

En la actualidad, no hay un tratamiento efectivo para las vacas infectadas que pueda prevenir la transmisión vertical (Anderson et al. 2000; McAllister y Latham, 2002; Dubey 2003b). Sin embargo, experimentos en ratones han evidenciado que el uso de los anticoccidiales derivados de la triazina, como toltrazuril y ponazuril, previenen la formación de lesiones cerebrales y además disminuye la detección de DNA parasitario por medio de PCR en más de 95% (McAllister & Latham, 2002).

El tratamiento con trimetoprim y sulfadiazina combinado con pyrimetamina por 4 semanas ha sido usado con moderado éxito en el tratamiento de cachorros infectados congénitamente, si se lo administra antes (y no después) de que se desarrolle una severa parálisis y encefalitis (Dubey & Lindsay 1996b). También ha mostrado ser efectivo el tratamiento en base a Clindamicina durante 4 o más semanas. Aún no existen drogas que destruyan los quistes de tisulares de *Neospora* en el SNC (Dubey 2003b).

i. Prevención y Control

Las estrategias de control y prevención se han focalizado en programas para reducir el número de animales congénitamente infectados en el rodeo y minimizar la oportunidad de transmisión postnatal desde el medioambiente. (Anderson et al. 2000).

La elaboración de programas de control para *N. caninum* en los rodeos lecheros debe considerar tanto las vías de transmisión horizontal como vertical. Se deben hacer esfuerzos para limitar la transmisión vertical y horizontal simultáneamente para prevenir la infección por *N. caninum* en el ganado (Otranto et al. 2003¹¹⁹).

- **Infección post natal**

La transmisión horizontal en ganado, generalmente ocurre en un rango bajo (<5%), excepto en casos de brotes de abortos en los rodeos con evidencia de ser provocado por una exposición a fuente de infección medioambiental. La exposición del ganado a través de contaminación del alimento o de las fuentes de agua, con heces de perros infectados o probablemente cánidos salvajes que han eliminado ooquistes, es la fuente de exposición ambiental más probable. Deben tomarse medidas con los tejidos potencialmente infectados, como fetos abortados, membranas fetales o terneros muertos (Dubey 1999a⁵⁰; Anderson et al., 2000; Dijkstra et al. 2001⁴⁵; McAllister y Latham, 2002; Dubey 2003b). Estos deberán ser incinerados para que no estén disponibles para el hospedero definitivo.

La serología en los perros no es una herramienta útil debido a que la seropositividad del perro puede deberse a su infección como hospedero intermediario (Dubey et al. 1996a⁴⁸), posiblemente infectado in útero, en la cual no se produciría el ciclo sexuado del protozooario con eliminación de ooquistes, y a la evidencia existente de que perros eliminando ooquistes pueden no seroconvertir (McAllister et al. 1998b¹⁰²; Lindsay et al. 1999⁹³).

Reducir la posibilidad de contaminación fecal en los alimentos o fuentes de agua debida a los perros u otros potenciales huéspedes definitivos, como los zorros.

El calostro de vacas infectadas podría teóricamente ser potencialmente capaz de transmitir infección post natal a los terneros.

- Infección transplacentaria

La transmisión vertical de la *N. caninum* de una madre al feto es muy eficiente (>80%) y es suficiente para mantener la infección en rebaños por largos períodos de tiempo, sin la necesidad de tener una nueva introducción de la infección en el rebaño desde el medio ambiente (ooquistes) o de fuentes externas (comprando hembras infectadas).

Debido a que la principal vía de transmisión es la vertical y que vacas seropositivas a *N. caninum* tienen mayor riesgo de abortar, se podría disminuir el número de vacas positivas o congénitamente infectadas en el predio, como también evitar la introducción de animales seropositivos (Paré et al. 1998¹²⁴; Anderson et al., 2000; Dubey 2003b; Hall et al. 2005⁷¹). Pero no hay evidencia de que la eliminación de animales seropositivos a *Neospora* genere un beneficio económico que justifique esta medida (Barr et al. 1997¹⁶). En predios con baja prevalencia de la enfermedad, podría ser recomendable evitar la cruce o inseminación de vacas seropositivas, disminuyendo así la transmisión vertical (Hall et al. 2005). Moore (2005b)¹¹³ plantea evaluar las ventajas y desventajas de los predios libres de infección debido al aumento de probabilidad de tormentas de abortos en predios sin contacto previo con el agente. Además, en rodeos lecheros, plantea evaluar si existen pérdidas diferentes al aborto que justifiquen la eliminación de animales seropositivos.

El control de la transmisión vertical requiere de la identificación de las vacas infectadas a través de un chequeo serológico. Según Moen et al. (1998)¹⁰⁸ el status serológico puede ser usado como criterio de refugio, para así disminuir el futuro riesgo de aborto en los rodeos lecheros. Estos y otros autores concluyen que las terneras infectadas por *N. caninum* no deberían ser usadas como reemplazos para así disminuir el futuro riesgo de aborto en los rodeos (Björkman et al. 1996²³; Thurmond & Hietala 1997a¹⁵⁷; Hobson et al. 2005).

Hasta el momento, el refugio es la única vía para prevenir la transmisión de vaca a ternero.

La transferencia de embriones de hembras seropositivas a receptoras seronegativas (usando procedimientos propuestos por la International Embryo Transfer Society) puede prevenir la transmisión vertical de la *N. caninum* (Baillargeon et al. 2001⁷; Landmann et al. 2002⁸⁹).

También debe tenerse en cuenta que un rebaño con baja prevalencia está en mayor riesgo de abortos severos y pérdidas reproductivas si hay una exposición importante a una fuente medioambiental que produzca nuevas infecciones en el ganado previamente no infectado, por lo cual deben considerarse simultáneamente medidas para evitar la infección post natal, pero la existencia de un ciclo silvestre del parásito y el desconocimiento de aspectos epidemiológicos como el rol del zorro en nuestras condiciones productivas limitan las posibilidades de la prevención.

En rodeos con Neosporosis endémica, las hembras congénitamente infectadas que son retenidas, es más probable que aborten que las hembras no infectadas, especialmente durante la primera preñez, lo que sustenta la opción de refugar esos animales. Sin embargo, el refugio es caro y puede disminuir la inmunidad del rebaño.

Además el refugio puede ser inefectivo si el ganado remanente ingiere ooquistes de *N. caninum*.

Vacunación

La inoculación de las vacas con taquizoitos de *N. caninum* seis semanas antes de la preñez proveyó protección contra la transmisión vertical del parásito cuando las vacas fueron expuestas a los taquizoitos durante la mitad de la gestación (Innes et al. 2001).

La inmunidad mediada por células, involucrando citoquinas como el interferón gamma (IFN γ) son componentes importantes de inmunidad protectora contra la *N. caninum*. Durante la preñez, citoquinas pro-inflamatorias como el interferón gamma son regulados en baja, en particular en la interfase materno-fetal, donde dichas respuestas pueden ser muy dañinas y perjudiciales para el transcurso de la preñez. Los eventos claves en la patogenia de la Neosporosis en el ganado, involucran el recrudecimiento de una infección persistente, el momento y la severidad de la parasitemia durante la preñez. El momento de la parasitemia en la gestación es determinante para el resultado de la enfermedad, resultando un factor crítico la edad gestacional del feto al momento de la transmisión (Maley et al. 2003).

El ganado puede desarrollar un grado de inmunidad protectora contra el parásito. Animales que experimentaron un aborto debido a Neosporosis tienen una probabilidad decreciente de sufrir un siguiente aborto causado por el mismo agente de infección (Anderson et al. 1995; Wouda et al. 1998). Sin embargo, como el ganado infectado con *N. caninum* previamente a la preñez puede sufrir abortos, la inmunidad generada por una exposición previa al parásito es insuficiente para protegerlo contra el aborto en todos los casos.

Las vacas con evidencia de una exposición previa a la *N. caninum* tuvieron menor probabilidad de abortar o de tener un ternero prematuro durante una epidemia de Neosporosis (brote provocado por una exposición) que las vacas con una infección primaria de *N. caninum*. Este hallazgo sugiere un desarrollo de la inmunidad protectora en vacas previamente infectadas (McAllister et al. 2000¹⁰³).

La utilización de vacunas inactivadas disminuye la tasa de abortos pero los anticuerpos vacunales aún no pueden diferenciarse de los producidos en la infección. Tampoco existe información concluyente respecto a la eficacia de la vacuna en reducir la infección fetal o en prevenir la infección post natal en vacas no infectadas (Anderson et al. 2000). Sin embargo, existen estudios que indican que la vacuna tiene la capacidad de reducir la incidencia de abortos (Romero et al. 2004¹³⁹), pero no genera protección contra la transmisión vertical del parásito (Estill 2004⁵⁶). Estudios experimentales realizados en ratones mostraron prevención de la ocurrencia de signos clínicos y disminución de la carga parasitaria al emplear una vacuna recombinante NcMIC1 (Alaeddine & Hemphill 2004²).

2. CARACTERIZACIÓN DEL PROBLEMA

La Neosporosis bovina es una enfermedad que está extendida a nivel mundial y ha sido caracterizada como la principal causa de aborto bovino en muchos países (Dubey & Lindsay 1996b). A pesar de haber sido recientemente diagnosticada se han encontrado valores de seroprevalencia en ganado de carne del 14% con presencia en el 70% de los establecimientos (Repiso et al. 2005).

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 & Hietala 1997b¹⁵⁸, Hobson et al. 2002⁷⁶), muerte fetal temprana, mortalidad neonatal, alargamiento de los períodos interpartos, aumento de las tasas de refugo y reducción de los animales de reemplazo (Trees et al. 99¹⁶², Hernández et al. 2001⁷³).

Dado que el huésped genera una deficiente respuesta inmunitaria contra el patógeno, pueden producirse abortos repetidos y repetición de la infección congénita, perpetuándose con los animales infectados, la enfermedad en el tiempo y en el rodeo (Dubey & Lindsay 1996b⁴⁹).

En virtud de la importancia de los rubros de producción bovina en la economía del país y las pérdidas que significa la presencia de problemas sanitarios causantes de fallas reproductivas, es imprescindible conocer mejor la epidemiología de la *Neosporosis* en nuestros sistemas productivos, de manera de permitir la adopción de medidas preventivas y la elaboración de planes de control.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Describir la epidemiología de la Neosporosis en la principal cuenca lechera del Uruguay.

Objetivos Específicos

- Estimar la seroprevalencia de *N. caninum* en las vacas en lactación de la cuenca lechera Sur del Uruguay.
- Estimar la seroprevalencia en los perros de los establecimientos lecheros de la cuenca lechera Sur del Uruguay.
- Establecer el grado de asociación entre las serologías halladas en caninos y bovinos.
- Identificar los factores de manejo asociadas a la presencia de serología positiva a la Neosporosis.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal en la cuenca lechera Sur del Uruguay, comprendiendo predios lecheros de los departamentos de Florida, San José y Colonia. En total el estudio incluyó 117 establecimientos de un área geográfica que abarca aproximadamente 800 rodeos y una población animal de 120.000 vacas lecheras, y fue realizado entre los años 2001 y 2003.

Bovinos

El muestreo fue realizado en dos etapas, primero se seleccionaron los establecimientos, quedando excluidos los que contaran con menos de 30 vacas en ordeño. Se utilizaron dos estrategias, la primera de ellas involucró a los técnicos que brindan asesoramiento veterinario en estos departamentos y que estuvieran dispuestos a participar del estudio. La segunda consistió en un muestreo aleatorio estratificado por departamento, utilizando como marco de muestreo la base de datos de DICOSE (Dirección de Contralor de Semovientes – Ministerio de Agricultura y Pesca), totalizando 84 establecimientos.

Luego de seleccionados los establecimientos se tomaron muestras de 20 animales en producción seleccionados por muestreo aleatorio sistemático.

Se extrajeron 10 ml de sangre de cada animal, con agujas descartables de 18G x 1 y ½ y jeringas descartables de 10ml. La sangre se trasladó al laboratorio acondicionada y refrigerada en tubos de borosilicato de 100 x 10mm. En el laboratorio y luego de producido el proceso de formación del coágulo se centrifugó 10 minutos a 2000 rpm, se separó el suero, y se almacenó en dos viales especiales para bajas temperaturas con tapa de rosca que se congelaron en freezer de -20° C en cajas para 50 viales hasta su utilización. Por cada animal se utilizó una aguja, una jeringa, un tubo con tapón de silicona y dos viales tipo eppendorf nuevos y estériles.

Los anticuerpos contra *N. caninum* fueron detectados mediante la técnica de ELISA empleando el kit comercial ELISA CHEKIT (Bommeli Diagnostics, Suiza). El total de muestras de suero analizadas fue 1597. Para este kit Von Blumröder et al. (2004)¹⁶⁶ reportaron una Sensibilidad relativa de 95,9% y una Especificidad = 100%. De acuerdo a las instrucciones del fabricante (NEO1135E -25.07.02 versión 1), luego de la validación de cada placa, se realizó la interpretación del resultado de la densidad óptica de cada muestra mediante el cálculo del valor porcentual (%) = $[(OD_{\text{muestra}} - OD_{\text{neg}})/(OD_{\text{pos}} - OD_{\text{neg}})] \times 100$. Siendo positivas las muestras con valor % > 50%, negativas las muestras con valor % < 40% y dudosas cuando el valor % se encuentra entre 40% y 50%. Para las estimaciones de prevalencia se adoptó un criterio conservador basado en la alta especificidad reportada para el kit (Von Blumröder et al. 2004¹⁶⁶), considerando los resultados dudosos como positivos.

Se realizaron formularios tanto para la toma de muestras como para la realización del cuestionario a fin de recabar la información del establecimiento y los animales muestreados (Anexo).

Los datos de los establecimientos se obtuvieron por entrevista personal del titular a cargo del tambo, solicitándole además acceder a los registros del establecimiento o a

los sistemas informáticos de registro. Las variables a relevar incluyeron aspectos de manejo de los animales, datos sanitarios, productivos y reproductivos. (Anexo).

Perros

Se coordinó el muestreo con la “Comisión Nacional Honoraria de Lucha contra la Hidatidosis” (CNHLCH). Junto a sus técnicos se tomaron muestras de los perros de los establecimientos que participaron voluntariamente en el estudio (45 tambos), y de 33 establecimientos lecheros de las mismas zonas, los cuales fueron seleccionados directamente por los técnicos de la CNHLCH. En estos últimos no se tomaron muestras de los bovinos. El total de establecimientos en que se evaluó la serología de los perros fue de 78, de los cuales 12 pertenecen al departamento de Colonia, 55 a Florida y 11 de San José. En los mismos fueron muestreados todos los perros totalizando 212 muestras de sueros. Seis establecimientos lecheros en los cuales se evaluó la serología en bovinos no poseían perros.

La sangre colectada fue remitida al laboratorio donde se procedió a la separación del suero, para luego almacenarlo a -20°C. Las muestras de suero fueron analizadas para detectar la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), utilizando kits comerciales NC -1 *N. caninum* (VMRD Inc.) en la DILAVE (Dirección Laboratorio Veterinario - Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca). Esta es la prueba de referencia utilizada en caninos (Dubey 1996). Debido a que los taquizoitos intactos son utilizados como antígeno, tiene baja reacción cruzada con otras coccidias, especialmente *T. gondii*, siendo utilizada como prueba verdadera para evaluar otras técnicas serológicas para detección de anticuerpos en perros como la iscom-ELISA (Björkman & Uggl 1999a²⁵; Lasri et al. 2004⁹⁰).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó preservando las características del diseño, utilizando el software estadístico Intercooled STATA 8.2. (Stata Corp. 2003)¹⁵¹ Se estimaron las prevalencias con sus intervalos de confianza de 95%. Para estimar la seroprevalencia en bovinos los datos se ponderaron de acuerdo al diseño, considerando el tamaño del establecimiento, el marco geográfico del estudio (Florida, San José y Colonia) y la estrategia de selección, realizando las proyecciones a la población mediante las rutinas para análisis de “survey data” del STATA. El peso para el análisis fue definido como el inverso de la probabilidad de selección del establecimiento multiplicado por la probabilidad de selección de los animales dentro de cada rodeo [$1/(P_{\text{establecimiento}} * P_{\text{animal}})$]. Los números de establecimientos por estrato se obtuvieron de la base de DICOSE 2002 teniendo en cuenta las regiones departamentales seleccionadas para este estudio, de acuerdo al diseño aleatorio estratificado. En el caso de establecimientos seleccionados por los veterinarios que participaron en el estudio, la probabilidad de selección del establecimiento en el estrato fue considerada = 1. En la rutina de análisis fueron definidos los estratos (departamentos) y los clusters (establecimientos).

Para estimar la difusión (establecimientos con presencia serológica de anticuerpos contra *N. caninum*) se estudió la distribución de los establecimientos en función de las seroprevalencias con las rutinas de muestreo “survey data” del STATA, post-estratificando por serología (vacas seropositivas).

El estudio de los factores asociados a la seroprevalencia de *N. caninum* en los establecimientos se realizó mediante un estudio de **casos y controles**. Se definieron como “casos” aquellos establecimientos con al menos 4 animales seropositivos a la prueba ELISA, equivalente a una seroprevalencia intra -rodeo 20%. De esta manera los 84 establecimientos quedaron divididos en 39 controles y 45 casos. El estudio de la asociación entre los casos (alta serología) y los factores de riesgo se realizó primero en forma univariada, para cada una de las variables explicativas (posibles factores) y **casos-controles** como variable de respuesta. Las variables dicotómicas corresponden a **0** “Ausencia del Factor de Riesgo” y **1** “Presencia del Factor de Riesgo”. La asociación fue evaluada mediante el Odds Ratio (OR: Relación de las Odds), o razón de probabilidades de ser caso habiendo sido expuesto al FR y no habiéndolo sido. Mide aproximadamente cuanto más probable es que sea *caso* un establecimiento con exposición al FR que uno no expuesto, proporcionando una estimación del riesgo de ser *caso* en presencia de exposición al factor. Para factores con más de dos categorías en escala ordinal se utilizaron pruebas de Chi cuadrado de homogeneidad y de tendencia con los procedimientos de Mantel-Haenszel (Fleiss 1981⁵⁹). Luego del análisis univariado se pasó a un análisis multivariado de regresión logística utilizando el método *backward stepwise estimation*. El modelo inicial comenzó con las variables que en forma individual mostraron significación menor a 0.25 (Hosmer & Lemeshow 2000⁷⁸). Las variables fueron removidas del modelo de acuerdo a la significación (valor p) de la prueba de Wald ajustada.

Las variables cuantitativas fueron evaluadas mediante pruebas-t (Student) para diferencias entre medias de los grupos (casos y controles) y en forma multivariada mediante Análisis de Regresión Múltiple para controlar posibles variables confundentes. Los porcentajes de abortos y el número de servicios por preñez fueron evaluados mediante la prueba de suma de rangos de Mann -Whitney para muestras independientes.

La proyección de los datos en perros se estimó a través de análisis para muestreo por conglomerados (Scheafer et al. 1987¹⁴⁸). La relación entre la serología en bovinos y caninos fue evaluada mediante una prueba de Chi cuadrado de tendencia y por su OR (odds ratio) (Fleiss 1981⁵⁹).

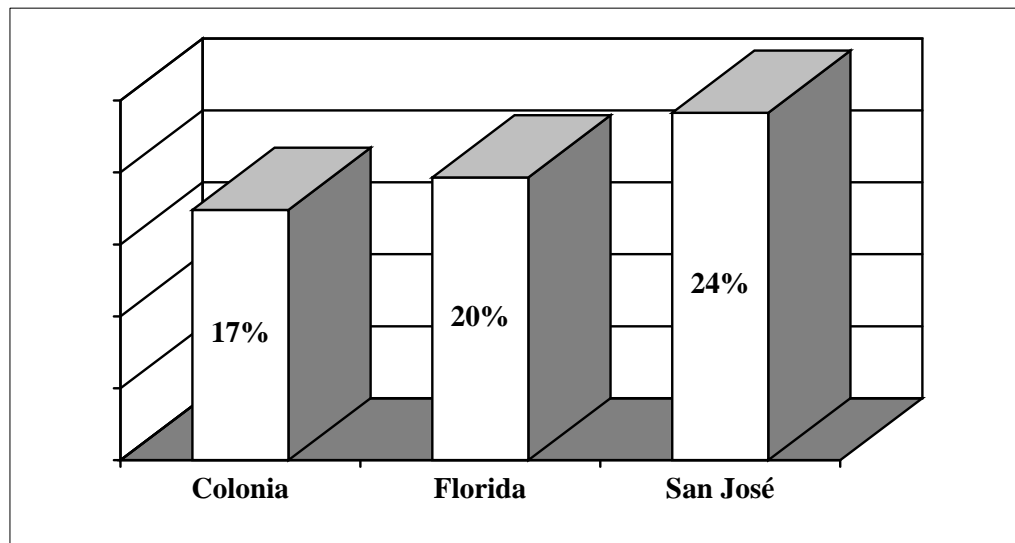
5. RESULTADOS

Bovinos

Estudio de Seroprevalencia

La estimación de la seroprevalencia en bovinos es de 22 % de vacas seropositivas, siendo su intervalo de confianza (IC 95%) de 16,8% - 27,2%.

La estimación de la seroprevalencia de vacas seropositivas por departamento se muestra en la Gráfica 1, y los respectivos intervalos de confianza (IC 95%) se presentan en la Tabla i.



Gráfica 1. Seroprevalencia para *N. caninum* por departamento

Tabla i. Seroprevalencias y sus Intervalos de confianza de 95% para *N. caninum* por departamento

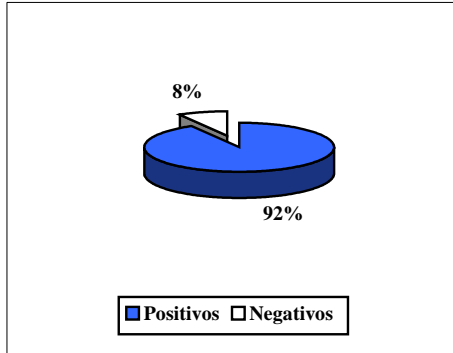
pweight: w	Number of obs =	1597			
Strata: depto	Number of strata =	3			
PSU: codigo	Number of PSUs =	84			
	Population size =	48490.796			

Subpop.	Estimate	Std. Err.	[95% Conf. Interval]	Obs	

neospora					
Colonia	.1738196	.0389631	.0962952 .251344	426	
Florida	.1966287	.0213323	.154184 .2390734	766	
San_Jose	.2415771	.0402044	.161583 .3215712	405	

Difusión en rodeos lecheros

La difusión de *N. caninum* en los rodeos lecheros de la cuenca estudiada se muestra en la Gráfica 2, mientras que su intervalo de confianza (IC 95%) se presentan en la Tabla ii.



Gráfica 2. Rodeos con al menos una vaca seropositiva.

```

Survey proportions estimation
+-----+
| Estim. Std.Err. [95%Conf.Interval] |
+-----+
| 0.918 0.0358 0.8474 0.9876 |
+-----+
    
```

Tabla ii. Intervalo de confianza para la proporción de rodeos seropositivos para *N. caninum*.

La estimación de la proporción de rodeos con al menos una vaca seropositiva a *N. caninum* en cada departamentos se muestra en la Tabla iii.

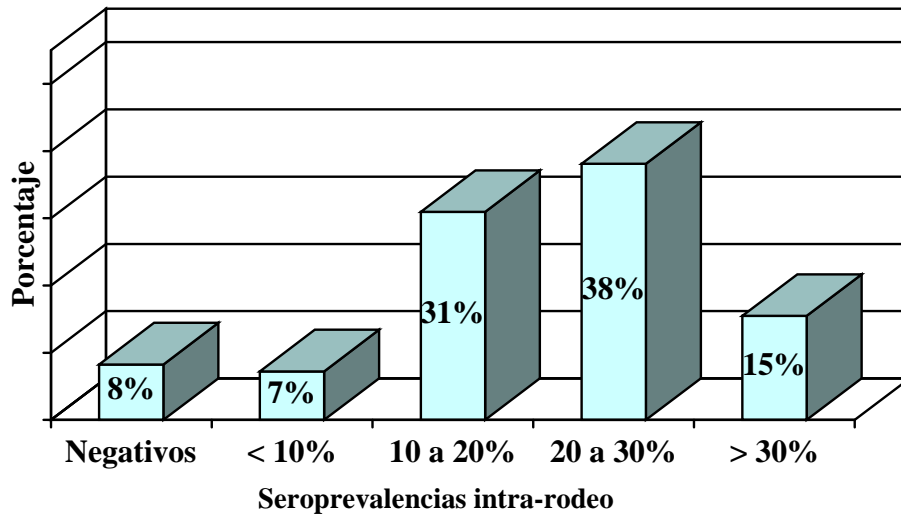
La distribución de rodeos lecheros de acuerdo a proporción de vacas seropositivas para *N. caninum* intra-rodeo se muestra en la Gráfica 3. La amplitud de variación fue entre 0% y 62,5% (mediana 20%). La distribución en cada departamento s e presenta en las Tablas iv, v y vi.

Tabla iii. Difusión en bovinos para *N. caninum* por departamento.

```

Survey proportions estimation by depto
+-----+
| Obs Prop. Std. Err. |
+-----+
| Colonia 23 0.826087 0.080810 |
+-----+
| Florida 41 0.951220 0.034059 |
+-----+
| San José 20 0.900000 0.068825 |
+-----+

Pearson:
Uncorrected chi2(2) = 1.5006
Design-based F(1.62, 131.57) = 0.8084 P = 0.4249
    
```



Gráfica 3. Distribución de rodeos lecheros de acuerdo a proporción de vacas seropositivas para *N. caninum* intra-rodeo.

Tabla iv. Distribución de los rodeos según la seroprevalencia intra-rodeo para *N. caninum* en el departamento de Colonia.

Survey proportions estimation				
neos	Obs	Est. Prop.	Std. Err.	
< 10	7	0.304348	0.098100	
10-20	9	0.391304	0.104051	
20-30	3	0.130435	0.071802	
30-40	3	0.130435	0.071802	
> 40	1	0.043478	0.043478	

Tabla v. Distribución de los rodeos según la seroprevalencia intra-rodeo para *N. caninum* en el departamento de Florida.

Survey proportions estimation				
ineos	Obs	Est. Prop.	Std. Err.	
< 10	4	0.097561	0.046916	
10-20	12	0.292683	0.071941	
20-30	20	0.487805	0.079033	
30-40	5	0.121951	0.051740	

Tabla vi. Distribución de los rodeos según la seroprevalencia intra-rodeo para *N. caninum* en el departamento de San José.

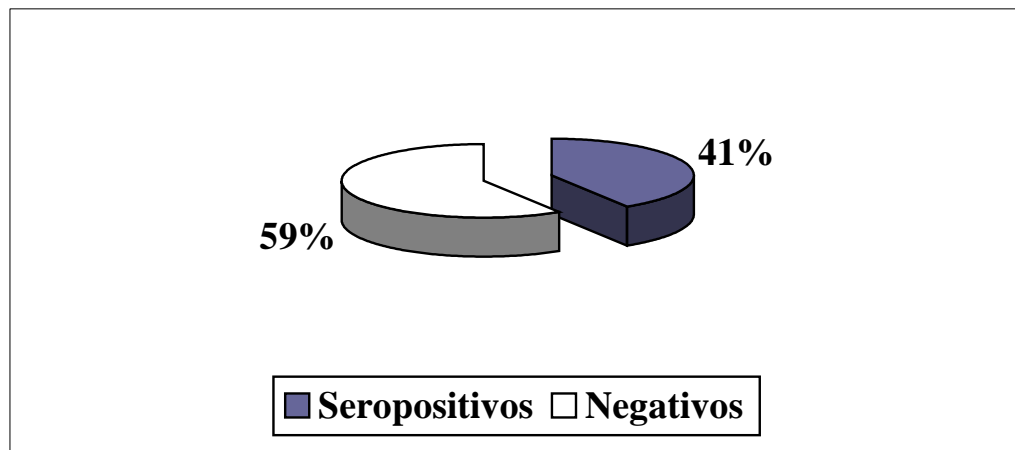
Survey proportions estimation				
ineos	Obs	Est. Prop.	Std. Err.	
< 10	2	0.100000	0.068825	
10-20	5	0.250000	0.099340	
20-30	9	0.450000	0.114133	
30-40	3	0.150000	0.081918	
> 40	1	0.050000	0.050000	

Perros

Se relevaron datos de los perros en 84 establecimientos lecheros, encontrándose en promedio 2,32 perros por tambo con un desvío estándar de 1,52 y un máximo de 10 perros en un tambo. Seis tambos no tenían perros.

Estudio de Seroprevalencia para *N. caninum*

La estimación de la seroprevalencia para *N. caninum* en perros se observa en la Gráfica 4. Su intervalo de confianza de 95% es de 34,3% - 47,8%.



Gráfica 4. Estimación de la proporción de perros seropositivos para *N. caninum*.

La estimación de la seroprevalencia de perros seropositivos por departamento se muestra en la Tabla vii.

Tabla vii. Seroprevalencia para *N. caninum* en perros por departamento.

Survey proportions estimation by depto				
	Obs	Est.Prop.	Std. Err.	N°Establ.
Colonia	29	0.241379	0.070342	12
Florida	148	0.418919	0.040345	55
San José	35	0.514286	0.092569	11

Pearson:

Uncorrected	chi2(2)	=	5.0294	
Design-based	F(1.94, 145.31)	=	2.5539	P = 0.0830

Difusión de la serología de *N. caninum* en perros de tambos

La difusión de la seropositividad en perros a *N. caninum*, en los rodeos lecheros de la cuenca estudiada se muestra en la Gráfica 5, mientras que su intervalo de confianza (IC 95%) se presentan en la Tabla viii.

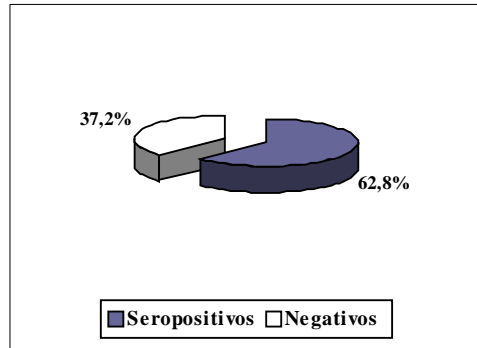
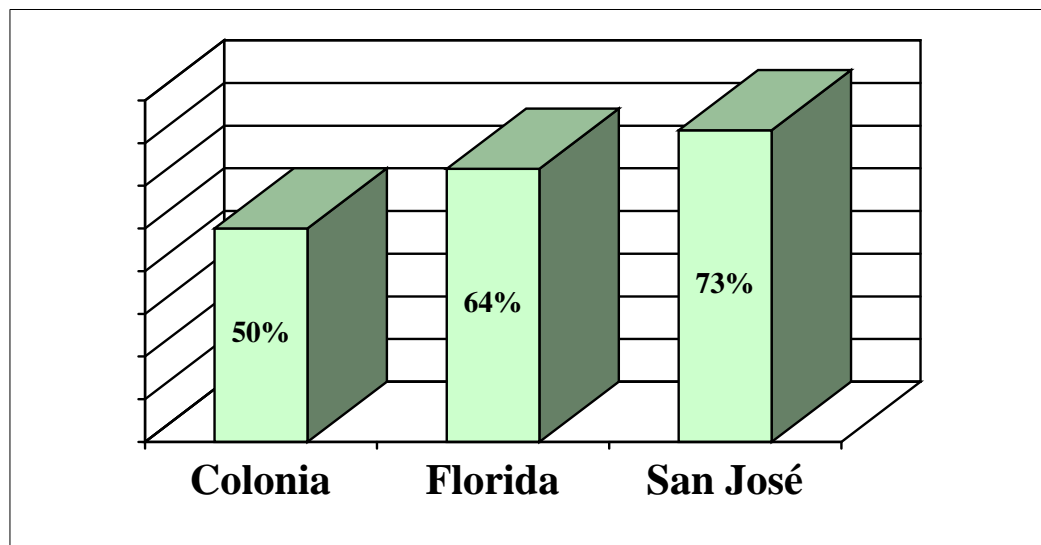


Tabla viii. Intervalo de confianza para la proporción de predios con al menos un perro seropositivo.

Survey proportions estimation			
Estim.	Std.Err.	[95%Conf. Interval]	
0.628	0.0553	0.5198	0.7367

Gráfica 5. Predios con al menos un perro seropositivo.

La estimación de la proporción de rodeos con al menos un perro seropositivo a *N. caninum* en cada departamentos se muestra en la Gráfica 6.



Gráfica 6. Difusión (predios con al menos un perro seropositivo) por departamento.

Estudio de Casos y Controles

Relación con presencia y serología en perros

No se encontró asociación entre el número de perros del establecimiento y la ocurrencia de casos ($p=0.314$). Los odds ratios encontrados para los diferentes números de perros no difieren del encontrado para establecimientos sin perro ($p=0.32$) ni manifiestan una tendencia ($p=0.64$). Tabla ix.

Tabla ix. Relación entre casos y controles con el número de perros por establecimiento.

	Número de perros					Total
	0	1	2	3	4	
Control	2	9	16	6	6	39
Caso	4	8	12	15	6	45
Total	6	17	28	21	12	84

Pearson $\chi^2(4) = 4.7497$ Pr = 0.314
Fisher's exact = 0.314

No_perros	Odds Ratio	chi2	P>chi2	[95% Conf. Interval]	
0	1.000000
1	0.444444	0.65	0.4188	0.058941	3.351320
2	0.375000	1.09	0.2962	0.055259	2.544851
3	1.250000	0.05	0.8250	0.172164	9.075637
4	0.500000	0.42	0.5145	0.059664	4.190132

Test of homogeneity (equal odds): $\chi^2(4) = 4.69$
Pr> $\chi^2 = 0.3203$

Score test for trend of odds: $\chi^2(1) = 0.22$
Pr> $\chi^2 = 0.6397$

Las proporciones de casos no mostraron diferencias significativas entre los establecimientos con perros y los que no tienen perros. Tabla x.

Tabla x. Relación entre la ocurrencia de casos y la presencia de perros.

	Sin perro	Tiene perro	Total
Control	2	37	39
Caso	4	41	45
Total	6	78	84

Pearson $\chi^2(1) = 0.4455$ Pr = 0.504
Fisher's exact = 0.409

Relación entre la serología en bovinos y la serología en perros para *N. caninum*

La presencia de al menos un perro seropositivos no constituyó un factor asociado a la alta serología en bovinos ($p=0.89$). Tabla xi.

Tabla xi. Relación entre las serologías de casos y controles con la serología en perros por establecimiento

	perr.pos	perr.neg	Total	Proportion Exposed
Cases	13	13	26	0.5000
Controls	12	13	25	0.4800
Total	25	26	51	0.4902
	Point estimate		[95% Conf. Interval]	
Odds ratio	1.083333		.3151023	3.730168
Attr. frac. ex.	.0769231		-2.173573	.7319155
Attr. frac. pop	.0384615			
chi2(1) = 0.02 Pr>chi2 = 0.8864				

El nivel de seroprevalencia en bovinos en los establecimientos no mostró relación con la presencia de perros positivos en el mismo. Tabla xii.

Tabla xii. Relación entre la serología en perros con el nivel de prevalencia en bovinos.

	Bovinos (% positivos)				Total
	< 10	10-20	20-30	>30	
Perros Negativos	4	9	10	3	26
Algún perro Positivo	3	9	10	3	25
Total	7	18	20	6	51
Pearson chi2(3) = 0.1233 Pr = 0.989					
Fisher's exact = 1.000					

Casos y controles – Análisis univariado

El análisis univariado de casos y controles para las variables dicotómicas incluyó el estudio de las siguientes variables independientes:

- Tomar de medidas de manejo y eliminación de placentas y fetos.
- Alimentación de los terneros con pool de le che.
- Origen de los reemplazos (propios o compra).
- Recría de animales en campos de recría.
- Si las vacas tienen contacto con zorros.
- Si las vacas tienen contacto con aves.
- Si las vacas tienen contacto con roedores.
- Si las vacas tienen contacto con perros.
- Si las vacas tienen contacto con gatos.
- Depósitos de alimentos accesibles a pájaros.
- Presencia de aves domésticas en el establecimiento.
- Utilización de nodrizas en la alimentación de los terneros.
- Acceso de roedores a los depósitos de alimentos.
- Acceso de los perros a los depósitos de alimentos.
- Realización de servicios con monta de toros.
- Sincronización de celos.
- Tipo de Asistencia veterinaria.

Tabla xiii. Resumen del análisis univariado de casos y controles para las variables dicotómicas.

variable	OR	signif	N_obs
vet	0.44571	0.34178	81
reemplazos	0.44871	0.19028	80
contacto_p	0.60000	0.43602	78
sincroniza	0.60156	0.31050	76
monta	0.86195	0.78040	78
c_recria	0.63636	0.32031	80
contacto_z	0.66176	0.39578	78
dep_pa	0.69053	0.44823	77
Nodrizas	0.75833	0.63448	71
dep_p	0.85526	0.73855	77
contacto_g	0.88888	0.79663	78
p_leche	0.93750	0.89395	69
dep_r	0.95454	0.92221	78
plac_fetos	1.02857	0.96864	73
contacto_r	1.26623	0.62013	79
contacto_a	1.29629	0.60753	78
aves	1.42857	0.44288	76

No se continuó con la realización de un modelo de regresión logística debido a que no hubieron por lo menos 2 variables con niveles de significación 0,25 en el análisis univariado.

Importancia de aborto como causa de refugo.

La proporción de productores que incluyen al aborto como causa de refugo fue de 54% en los casos mientras que en los controles fue de 40%, pero esta diferencia no resultó significativa.

Tabla xiv. Tabla de contingencia de casos y aborto como causa de refugo.

casos	aborto		Total
	Refuga	No refuga	
Control	12	18	30
Caso	21	18	39
Total	33	36	69

Pearson chi2(1) = 1.3028 Pr = 0.254
Fisher's exact = 0.332

Presencia de zorros

Los Odds ratios encontrados para los establecimientos con presencia de zorros moderada o elevada no difieren significativamente del encontrado para establecimientos que dicen no contar con la presencia de zorros ($p=0.76$) ni manifiestan una tendencia ($p=0.79$).

Tabla xv. Relación entre la presencia de zorros y los casos y controles de establecimientos.

	zorros			Total
	Ninguno	Pocos	Elevado	
Control	3	13	17	33
Caso	3	21	20	44
Total	6	34	37	77

Fisher's exact = 0.729

zorros	Odds Ratio	chi2	P>chi2	[95% Conf. Interval]	
Ninguno	1.000000
Pocos	1.615385	0.29	0.5923	0.274570	9.503843
Elevado	1.176471	0.03	0.8552	0.205033	6.750526

Test of homogeneity (equal odds): chi2(2) = 0.56
Pr>chi2 = 0.7564

Score test for trend of odds: chi2(1) = 0.07
Pr>chi2 = 0.7952

Calidad de la leche remitida

No se encontró asociación entre la calidad de la leche remitida y la ocurrencia de casos.

Tabla xvi. Relación entre casos-contróles y calidad de remisión de leche.

casos	calidad		Total
	B-A-AA	AAA	
Control	7	23	30
Caso	8	32	40
Total	15	55	70

Pearson chi2(1) = 0.1131 Pr = 0.737
Fisher's exact = 0.775

Inseminación Artificial

Los Odds ratios encontrados para las diferentes opciones de IA no difieren significativamente. Tabla xvii.

Tabla xvii. Relación entre casos-contróles y diferentes alternativas de Inseminación Artificial.

casos	ia				Total
	No IA	Nacional	Import.	Nac.e Imp.	
Control	15	2	5	13	35
Caso	13	3	10	18	44
Total	28	5	15	31	79

Fisher's exact = 0.620

ia	cases	controls	odds	[95% Conf. Interval]	
No IA	13	15	0.86667	0.41239	1.82138
Nacional	3	2	1.50000	0.25064	8.97694
Importado	10	5	2.00000	0.68361	5.85130
Nac.e Imp.	18	13	1.38462	0.67844	2.82583

Test of homogeneity (equal odds): chi2(3) = 1.79 Pr>chi2 = 0.6168

Variables Continuas

El promedio de producción de leche (litros/vaca/día) fue de 16,3 para el grupo control y 15,8 para los casos (tabla xviii). La diferencia observada de 0,48 litros vaca/día no resultó significativa ($p=0.47$) en el análisis univariado (prueba t). Tabla xix.

Tabla xviii. Media, error estándar y tamaño de muestra de observaciones para indicadores de producción.

stats		leche	iip	ppc	nsp	ración	vac.ord	vac_ab	superf
Control	mean	16.3	13.6	64	2.08	2.99	131	3.47	236
	se(mean)	.516	.252	5.9	.126	.281	15.1	.562	36
	N	33	29	30	22	30	39	34	32
Caso	mean	15.8	13.6	72.5	2.2	2.90	172	3.97	294
	se(mean)	.432	.322	5.41	.181	.187	33.6	.597	52.5
	N	40	31	32	26	44	45	43	43

Tabla xix. Análisis univariado sobre producción de leche.

Producción de leche (litros/vaca/día)						
Two-sample t test with equal variances						
Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Control	33	16.30303	.5158195	2.963158	15.25234	17.35372
Caso	40	15.82	.4324824	2.735259	14.94522	16.69478
combined	73	16.03836	.3313217	2.830814	15.37788	16.69883
diff		.4830303	.6679274		-.848779	1.81484

Degrees of freedom: 71 Ho: mean(Control) - mean(Caso)=0

t= 0.72 P = 0.47

Se evaluó un modelo de Regresión Múltiple sobre producción de leche cuyas variables iniciales fueron: Superficie del establecimiento, número de vacas en ordeño, realización de control lechero, fuente de los reemplazos, utilización de campos de recría, formación de lotes de alimentación, kg. de ración diaria y departamento.

El efecto de los casos ajustado por las variables incluidas en el modelo fue de -0,48 litros/vaca/día, pero de igual forma que en el análisis univariado la diferencia no resultó significativa (p=0,475). Tabla xx.

Tabla xx. Análisis multivariado sobre producción de leche.

```

xi: sw reg leche (casos) contrlech lotes vacas_ord superf kgrac_vac i.depto
reemplazos c_recria, pr(.2) pe(.05) lockterm1

i.depto          _Idepto_4-16      (naturally coded; _Idepto_4 omitted)
begin with full model
p = 0.7523 >= 0.2000  removing lotes
p = 0.7268 >= 0.2000  removing _Idepto_7
p = 0.6027 >= 0.2000  removing reemplazos
p = 0.5063 >= 0.2000  removing superf
p = 0.2491 >= 0.2000  removing contrlech
p = 0.2237 >= 0.2000  removing kgrac_vac
    
```

Source	SS	df	MS	Number of obs = 62		
Model	53.8743398	4	13.4685849	F(4, 57) =	2.07	
Residual	370.369527	57	6.49771101	Prob > F	= 0.0963	
Total	424.243867	61	6.95481749	R-squared	= 0.1270	
				Adj R-squared	= 0.0657	
				Root MSE	= 2.5491	

leche	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
casos	-.4766875	.6634935	-0.72	0.475	-1.80531	.8519353
_Idepto_16	-2.545177	1.043074	-2.44	0.018	-4.633897	-.4564574
c_recria	-1.197442	.7790216	-1.54	0.130	-2.757406	.3625214
vacas_ord	.0065665	.0032782	2.00	0.050	1.96e-06	.0131311
_cons	16.56309	.8741576	18.95	0.000	14.81261	18.31356

Porcentaje de abortos

Los porcentajes de aborto reportados por los productores tuvieron una media de 3,5% para los controles y 4% para los casos. En ambos grupos la mediana fue 3%. La prueba de suma de rangos de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre casos y controles (p=0,56). Tabla xxi.

Número de Servicios por Preñez

Los valores de número de servicios por preñez reportados por los productores tuvieron una media de 2,08 para los controles y 2,20 para los casos. En ambos grupos la mediana fue 2. La prueba de suma de rangos de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre casos y controles (p=0,53). Tabla xxii.

Tabla xxi. Análisis No-paramétrico sobre el porcentaje de aborto en vacas.

Porcentaje de abortos						
Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Control	34	3.470588	.5624547	3.279646	2.326266	4.614911
Caso	43	3.972093	.5969591	3.914523	2.767381	5.176805
combined	77	3.750649	.4140625	3.633384	2.925972	4.575326
diff		-.5015048				

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
casos	obs	rank sum	expected
Control	34	1269.5	1326
Caso	43	1733.5	1677
combined	77	3003	3003

unadjusted variance	9503.00
adjustment for ties	-81.19
adjusted variance	9421.81

Ho: vac_ab(Control) = vac_ab(Caso) z = -0.582 Prob > |z| = 0.5605

Tabla xxii. Análisis No-paramétrico sobre el número de servicios por preñez.

Número de servicios por preñez						
Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Control	22	2.082273	.125992	.5909551	1.820258	2.344288
Caso	26	2.200385	.1813984	.924954	1.826788	2.573982
combined	48	2.14625	.1131601	.7839958	1.918601	2.373899
diff		-.1181119	.2289039			

Two-sample Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test			
casos	obs	rank sum	expected
Control	22	509	539
Caso	26	667	637
combined	48	1176	1176

unadjusted variance	2335.67
adjustment for ties	-97.11
adjusted variance	2238.56

Ho: nsp(Control) = nsp(Caso) z = -0.634 Prob > |z| = 0.5260

Intervalo Inter-Parto

Las medias de intervalo inter-parto fueron de 13,6 meses para ambos grupos (casos y controles). El análisis univariado resultó en un valor de $p=0,96$. De igual forma el efecto ajustado por las variables incluidas en el modelo no resultó significativo ($p=0,327$). Tabla xxiii.

Tabla xxiii. Análisis sobre el intervalo inter-parto.

Intervalo Inter-Partos (meses)						
Two-sample t test with equal variances						
Group	Obs	Mean	Std. Err.	Std. Dev.	[95% Conf. Interval]	
Control	29	13.60345	.2523038	1.358698	13.08663	14.12027
Caso	31	13.58065	.3222041	1.793956	12.92262	14.23867
combined	60	13.59167	.2046396	1.585131	13.18218	14.00115
diff		.0228031	.413011		-.8039282	.8495345

Degrees of freedom: 58 t = 0.0552 P > |t| = 0.9562

```

xi: sw reg iip (casos) contrlech lotes vacas_ord superf kgrac_vac i.depto
reemplazos c_recria, pr(.2) pe(.05) lockterm1
i.depto          _Idepto_4-16      (naturally coded; _Idepto_4 omitted)
                begin with full model
p = 0.8828 >= 0.2000 removing lotes
p = 0.8099 >= 0.2000 removing contrlech
p = 0.5458 >= 0.2000 removing superf
p = 0.3099 >= 0.2000 removing vacas_ord
    
```

Source	SS	df	MS	Number of obs = 54		
Model	36.3942466	6	6.06570776	F(6, 47) =	2.88	
Residual	99.0872349	47	2.10823904	Prob > F =	0.0180	
Total	135.481481	53	2.55625437	R-squared =	0.2686	
				Adj R-squared =	0.1753	
				Root MSE =	1.452	

iip	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]	
casos	-.4212104	.4248067	-0.99	0.327	-1.275811	.4333904
reemplazos	-.8435784	.6391726	-1.32	0.193	-2.129428	.442271
c_recria	.9778906	.4770646	2.05	0.046	.0181604	1.937621
_Idepto_7	1.544314	.498517	3.10	0.003	.5414272	2.547201
_Idepto_16	2.150661	.6794436	3.17	0.003	.7837973	3.517526
kgrac_vac	-.3672572	.1430577	-2.57	0.013	-.6550522	-.0794622
_cons	13.12052	.6586273	19.92	0.000	11.79553	14.4455

6. DISCUSIÓN

Prevalencia y Difusión

El valor encontrado de seroprevalencia de $22\% \pm 5,2\%$ de vacas lecheras positivas a *N. caninum* está dentro de los rangos reportados internacionalmente (Dubey 2003b). También mantienen la tendencia de ser mayor en bovinos de producción de leche que en bovinos de carne (14%, Repiso et al. 2005), como fuera encontrado en otros estudios (Quintanilla-Gozalo 1999¹³⁵; Guimaraes et al. 2004⁶⁹).

Comparados con la región, la seroprevalencia estimada es mayor que la de Argentina, (16,6%, Moore et al. 2002¹¹⁰) y que Brasil (12%, 14,1%, 15% y 18,4%, Gondim et al. 1999⁶², Melo et al. 2004¹⁰⁷, Guimaraes et al. 2004⁶⁹ y Ogawa et al. 2005¹¹⁶), pero con menores niveles que Paraguay (36% Osawa et al. 2002¹¹⁸).

Con una tasa de transmisión post natal generalmente menor al 5%, exceptuando brotes de aborto epidémico (Hietala & Thurmond 1996⁷⁴, Davison et al. 1999⁴¹), el nivel de prevalencia encontrado indica que la infección en la población animal de la cuenca lechera sur del país está presente en forma endémica y posiblemente desde hace larga data.

En cuanto a la difusión del agente a nivel de los establecimientos, el valor encontrado de 92% es sumamente elevado, evidenciando la alta difusión que tiene la *N. caninum* en los rodeos lecheros de la cuenca sur. Este valor es coincidente con el encontrado por Corbellini et al. (2006)³⁹, que obtuvieron un 93,3% de establecimientos con al menos un animal seropositivo, en el sur de Brasil. Los valores recientes encontrados en Europa son menores, oscilando entre 16% y 76% de rodeos positivos (Bartels et al. 2006¹⁸).

La distribución de los establecimientos por la seroprevalencia intra-rodeo muestra que el 69% de los establecimientos tiene entre 10 y 30% de sus animales seropositivos, quedando el 15% de los establecimientos con más del 30% de animales positivos. Si bien la difusión es sumamente alta, aun la proporción de animales positivos intra-rodeo permite la adopción de medidas para el control.

Los resultados de la evaluación serológica de los perros muestra un patrón diferente a los bovinos. La seroprevalencia de $41\% \pm 6,8\%$ muestra un elevado porcentaje de perros que ha sido expuesto. Por otro lado la difusión en los rodeos es menor que en los bovinos, llegando a un 63% de establecimientos con algún perro positivo.

La seroprevalencia encontrada en los perros duplica al antecedente existente sobre perros de estancia de nuestro país de 20% de seropositividad (Barber et al. 1997). Ambos estudios utilizaron la técnica de IFI.

Con respecto a los valores de la región, la seroprevalencia de los perros rurales es menor que la encontrada en Argentina (48% y 54,2% Basso et al. 2001¹⁹), pero bastante mayor que las reportadas en Brasil (21% Guimaraes et al. 2004⁶⁹, 21,7% Uberlandia-Brasil (Fernandes et al. 2004⁵⁷) y Chile (26% Patitucci et al. 2001¹²⁷).

Con respecto a la prueba serológica utilizada, Von Blumröder et al. (2004)¹⁶⁶ compararon 12 diferentes métodos serológicos de detección de anticuerpos anti *N. caninum*, 11 pruebas de ELISA indirecto e IFAT (inmunofluorescencia indirecta) sobre un panel de 523 sueros bovinos en un estudio multicéntrico realizado en Europa. Para el kit comercial de Bommeli reportó una sensibilidad de 95,9% y una especificidad = 100% usando como prueba de oro la decisión adoptada por la mayoría de las pruebas evaluadas. Los autores concluyen con respecto al kit de Bommeli que sería posible utilizar un menor punto de corte para aumentar la sensibilidad del test sin producir pérdidas importantes de especificidad (este kit fue el único que obtuvo una especificidad = 100%). Basado en los datos de Von Blumröder et al. (2004)¹⁶⁶, de la alta especificidad de la prueba, en el presente este estudio se consideraron positivas aquellas muestras que obtuvieron un resultado dudoso, con valores porcentuales entre 40% y 50%, siguiendo un criterio conservador. (fueron dudosas 37 de las 1597 muestras).

Casos y controles

Teóricamente, diferentes niveles de riesgo pueden ser distinguidos en relación con la *N. caninum* en el ganado. En primer lugar el riesgo de un vaca de ser infectada con el parásito, riesgo de infección, y en segundo lugar el riesgo de un vaca infectada de abortar el feto, riesgo de aborto (Wouda et al. 2000¹⁷⁷).

Dado el alto nivel de difusión de la *N. caninum* en los rodeos lecheros (92% de establecimientos con al menos un animal positivo), se estableció como punto de corte para clasificar a los establecimientos como casos, un mínimo de 4 animales seropositivos. Ello equivale a una seroprevalencia intra-rodeo de 20%, que coincide a su vez, con la mediana de la distribución de seropositividad.

Por lo tanto se evaluó la asociación entre los diferentes factores estudiados con la alta seroprevalencia en los rodeos (20%). Es importante realizar esta precisión debido a que numerosos trabajos sobre factores de riesgo evalúan su asociación con la ocurrencia de abortos (y no con seropositividad).

Corbellini et al. (2006)³⁹, con un nivel de difusión similar al encontrado en este estudio (93,3% de establecimientos con al menos un animal seropositivo), emplearon para el análisis los valores de prevalencia intra-rodeo como variable dependiente en el modelo multivariado.

Relación con presencia, número y serología en los perros

La falta de asociación observada en este estudio entre la presencia de perros ($p=0,50$) y el número de perros en el establecimiento ($p=0,314$) con la alta seroprevalencia en bovinos, discrepa con la mayoría de los estudios existentes. Asociaciones positivas fueron encontradas por Corbellini et al. (2006)³⁹ OR=1,13 por cada perro adicional, mientras que Otranto et al. (2003)¹¹⁹ reportaron que las granjas con dos o más perros tenían mayor seropositividad intra-rodeo que las granjas con uno o ningún perro. La asociación entre la seropositividad de la *N. caninum* del ganado y la presencia de perros fue reportada por Ould-Amrouche et al. (1999)¹²⁰. Sánchez et al. (2003)¹⁴⁰

encontraron diferencias en seropositividad en bovinos de granjas con perros (58% de 158 animales) comparada a las granjas sin perros (35% de 43 animales).

Los estudios de Paré et al. (1998)¹²⁴ y Bartels et al. (1999)¹⁷ indicaron la presencia de perros como el factor de riesgo más importante asociado a la ocurrencia de abortos en el ganado. Coincidentemente Hobson et al. (2005)⁷⁷ observaron asociación entre el número total de perros en la granja (OR = 2,8) y la ocurrencia de abortos. Schares et al. (2004)¹⁴⁶, encontraron asociación entre granjas positivas (ELISA en tanque de leche) y la densidad de los perros en la región.

Sin embargo existen estudios cuyos datos coinciden con los del presente trabajo. Ogawa et al. (2005)¹¹⁶ no encontraron diferencias significativas entre serología a *N. caninum* y la presencia de perros. Por otra parte, Barling et al. (2001)¹³ encontraron una asociación negativa con uso de perros de trabajo en los establecimientos. Ellos especulan que dichos perros alejaban a posibles cánidos salvajes. En un estudio español, la proporción estimada de abortos atribuibles a *N. caninum* en rodeos no fue asociada al número de perros (Mainar-Jaime et al. 1999⁹⁸).

En el presente estudio tampoco se encontró asociación entre el estatus serológico de bovinos y perros, la presencia de al menos un perro seropositivos no constituyó un factor asociado a la alta serología en bovinos ($p=0.89$). El nivel de seroprevalencia en bovinos en los establecimientos tampoco mostró relación con la presencia de perros positivos en el mismo (Tabla xii). Estos datos no coinciden con los estudios realizados por Guimaraes et al. (2004)⁶⁹ y Wouda et al. (1999b)¹⁷⁶ quienes encontraron que la presencia de seropositividad en el perro estaba asociada a una alta prevalencia de infección en el ganado, indicando una relación entre la infección de *N. caninum* en ambas especies.

Los resultados del presente estudio podrían sugerir que en nuestras condiciones de producción la vía más importante de transmisión de la infección podría ser la transplacentaria, concordando con una situación de infección endémica en los rodeos, otra posibilidad sería, que tal vez podrían intervenir otros posibles huéspedes definitivos (cánidos salvajes). La presencia de alta serología en bovinos de establecimientos que no tienen perros, podría sugerir la posibilidad de una infección muy anterior en el tiempo, o la adquisición de animales crónicamente infectados, o infección horizontal por perros vecinos o cánidos salvajes, tal vez desde larga data.

La gran movilidad de los perros en las áreas rurales de nuestro país también es un factor importante a ser considerado para interpretar la falta de asociación entre la presencia de perros, como de su estatus serológico con la ocurrencia de casos.

Casos y controles – Análisis univariado

Todos los posibles factores que fueron estudiados en forma univariada no resultaron asociados significativamente a la alta seroprevalencia de los rodeos (no tomar de medidas con placentas y fetos; alimentación de los terneros con pool de leche; origen de los reemplazos (propios o compra); envío de animales a campos de recría; contacto de las vacas con zorros, aves, roedores, perros o gatos; presencia de aves domésticas en el establecimiento; utilización de nodrizas en la alimentación de los terneros; acceso de roedores, pájaros y perros a los depósitos de alimentos;

sincronización de celos; realización de servicios con monta de to ros y tipo de asistencia veterinaria).

Muchos de los factores estudiados otros estudios los han encontrado asociados a la seroprevalencia de *N. caninum*. La seropositividad del ganado fue asociada a la presencia de conejos y/o patos (Ould-Amrouche et al. 1999¹²⁰), mientras que el mismo estudio encontró una asociación negativa a la presencia de gatos.

En el estudio transversal llevado a cabo en Italia (Otranto et al. 2003¹¹⁹), el mejor predictor de la seroprevalencia en este estudio fue la práctica de reemplazo de las terneras, teniendo los rodeos que crían sus propios reemplazos mayores prevalencias intra-rodeo (RO= 18,3), sin embargo en el estudio realizado por Sanderson et al. (2000)¹⁴¹ sobre seroprevalencia y factores de riesgo, no observó relación entre el estatus serológico del ganado individual con el origen (compra o propio). En el estudio italiano, la presencia de dos o más perros interactuó significativamente con el tamaño de la granja y presencia de las aves de corral.

Barling et al. (2001)¹³ estudiaron factores de riesgo asociados a seroprevalencia en terneros de carne, encontrando asociación positiva con los reemplazos propios y el acceso de animales salvajes a los suplementos alimenticios de engorde.

Un incremento de riesgo de exposición a *N. caninum* fue asociado con cánidos salvajes (zorros grises y coyotes) y un aumento de la densidad de ganado de carne (Barling et al. 2000b¹²). Sin embargo en el presente estudio la presencia de zorros no demostró asociación con la seroprevalencia en bovinos (p=0.76).

Corbellini et al. (2006)³⁹ reportó asociación entre la seroprevalencia y el empleo de pool de calostro (OR=1,79). La presencia de aves de corral fue un factor de riesgo para los tormenta de abortos asociados a *N. caninum* (Bartels et al. 1999)¹⁷.

Sin embargo Ogawa et al. (2005)¹¹⁶ en el estado d Paraná-Brasil no encontraron diferencias significativas entre serología a *N. caninum* y alimentación, presencia de perros, gatos y roedores. En un estudio realizado sobre establecimientos lecheros en Canadá, se encontró una seroprevalencia de 19,2% (Chi et al. 2002)³³. Mediante un análisis factorial fueron evaluadas 27 variables, no encontrándose ninguna asociación con la serología a *N. caninum*

Indicadores de Producción

En el presente estudio, los indicadores de producción evaluados (producción de leche, porcentaje de abortos, número de servicios por preñez e intervalo interparto) no mostraron diferencias significativas entre los casos y los controles.

El impacto de la enfermedad radica en las pérdidas directas ocasionadas por los abortos, pero se han mencionado otras pérdidas como la posible disminución de la producción de leche en vacas seropositivas (Thurmond & Hietala 1997b)¹⁵⁸, muerte fetal temprana, mortalidad neonatal, infertilidad, alargamiento de los períodos interpartos, aumento de la tasa de refugio y reducción de los animales de reemplazo (Dubey 1999b⁵¹; Trees et al. 99¹⁶²; Hernández et al. 2001⁷³). Hernández et al. (2001)⁷³ comunicaron una disminución en la producción láctea de 2,8 lb/vaca/día en

las vacas seropositivas, aunque la existencia de otras pérdidas distintas al aborto asociadas a la seropositividad es aún tema de controversia (Moore 2005b)¹¹³.

En contraste a los reportes de disminución de la producción de leche asociados a la seropositividad, Pfeiffer et al. (2002)¹³³ encontraron que las vacas seropositivas produjeron más leche que las seronegativas. Por otro lado Hobson et al. (2002)⁷⁶ no observaron diferencias significativas en la producción de leche en rodeos sin problemas de aborto. Ogawa et al. (2005)¹¹⁶ no encontraron diferencias significativas entre serología a *N. caninum* y la producción de leche.

López-Gatius et al. (2005)⁹⁷ en rodeos con alta incidencia de abortos por *N. caninum*, no encontraron diferencias en el % de preñez entre vacas seropositivas y seronegativas, pero los porcentajes de aborto fueron 30,1% para las vacas seropositivas y 4,2% para las seronegativas, concluyendo que la infección con *N. caninum* no afecta la fertilidad en vacas lecheras de alta producción.

En un estudio francés, un aumento del intervalo interparto y altos contajes de células somáticas se asociaron negativamente con la seropositividad del ganado (Ould-Amrouche et al. 1999¹²⁰).

7. CONCLUSIONES

La seroprevalencia de anticuerpos anti *N. caninum* estimada en bovinos fue de 22% \pm 5,2% con una difusión en el 92% de los rodeos con al menos un bovino seropositivo. La seroprevalencia intra-rodeo varió entre 0% y 62,5%, con una mediana= 20%.

El promedio de perros por establecimiento fue 2,32 \pm 1,52, con una seroprevalencia de anticuerpos anti *N. caninum* de 41% y una difusión de 61% de establecimientos lecheros con al menos un perro seropositivo a *N. caninum*.

En el estudio de casos y controles, la seroprevalencia en bovinos no mostró relación con la presencia o el número de perros. El nivel de seroprevalencia en bovinos en los establecimientos no mostró relación con la presencia de perros positivos en el mismo

Ninguno de los factores de manejo evaluados resultaron asociados significativamente a la alta seroprevalencia de los rodeos. Los factores estudiados fueron: toma de medidas con placentas y fetos; alimentación de los terneros con pool de leche; origen de los reemplazos (propios o compra); envío de animales a campos de recría; contacto de las vacas con zorros, aves, roedores, perros o gatos; presencia de aves domésticas en el establecimiento; utilización de nodrizas en la alimentación de los terneros; acceso de roedores, pájaros y perros a los depósitos de alimentos; sincronización de celos; realización de servicios con monta de toros y tipo de asistencia veterinaria.

Los indicadores de producción evaluados (producción de leche, porcentaje de abortos, número de servicios por preñez e intervalo interparto) no mostraron diferencias significativas entre los casos y los controles.

No pudieron ser identificados factores de riesgo o protección asociados a altas seroprevalencias intra-rodeo en nuestras condiciones productivas.

En resumen, *N. caninum* se encuentra presente en nuestro ganado lechero, con una muy amplia difusión en la cuenca sur del país.

Este estudio contribuye con información sobre la situación epidemiológica de *N. caninum* en la cuenca lechera sur del país, que pueden ser base para establecer acciones que tiendan a prevenir o controlar la enfermedad, estudiar su progreso en el tiempo, así como la evaluación de medidas que se puedan implementar.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguado-Martínez A, Alvarez-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. *J Vet Diagn Invest* 17:442-50.
2. Alaeddine F, Hemphill A. (2004). Vaccination of mice against experimental *Neospora caninum* infection using NcMIC1-recombinant antigen and DNA-vaccination. *Int J Med Microbiol* 293: 80-81.
3. Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, McAllister M, Daft B, Kinde H, Read DH, Dubey JP, Conrad PA, Barr BC. (1995). Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J Am Vet Med Assoc* 207:1206-1210.
4. Anderson M, Reynolds J, Rowe J. (1997). Evidence of vertical transmission of *Neospora sp.* infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 210:1169-1172.
5. Anderson M, Andrianarivo A, Conrad P. (2000). Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci* 60-61: 417-431.
6. Atkinson R, Harper P, Reichel M, Ellis J. (2000). Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infection of cattle. *Parasitol Today* 16:110-114.
7. Baillargeon P, Fectear G, Paré J, Lamothe P, Sauve 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. *J Am Vet Med Assoc* 218:1803-1806.
8. Bañales P, Easton C, Haritani M, Kashiwazaki Y, Paullier C, Pizzorno M. (1999). Aborto Bovino por *Neospora caninum* en el Uruguay: Primeros diagnósticos. *Veterinaria* 34: 28-32.
9. Bañales P, Easton C, Haritani M, Kashiwazaki Y, Paullier C, Pizzorno M. (2000). Bovine abortion in Uruguay caused by *Neospora caninum*: First diagnosis. Proceedings XXI World Buiatrics Congress, December 2000, Punta del Este, Uruguay.
10. Barber JS, Gasser RB, Ellis J, Reichel, MP, Trees AJ. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J Parasitol* 83:1056-1058.

11. Barling KS, McNeill JW, Thompson JA, Paschal JC, McCollum FT, Craig TM, Adams LG. (2000a). Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J Am Vet Med Assoc* 217:1356-1360.
12. Barling KS, Sherman M, Peterson MJ, Thompson JA, McNeill JW, Craig TM, Adams LG. (2000b). Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. *J Am Vet Med Assoc* 217:1361-1365.
13. Barling KS, McNeill JW, Paschal JC, McCollum 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. *Prev Vet Med* 52:53-61.
14. Barr BC, Conrad PA, Sverlow KW, Tarantal AF, Hendrickx AG. (1994). Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection in the nonhuman primate. *Lab Invest* 71: 236-242.
15. Barr BC, Anderson ML, Sverlow KW, Conrad PA. (1995). Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet Rec* 137:611-613.
16. Barr B, Bjerkäs I, Buxton D, Conrad P, Dubey J, Ellis J, Jenkins M, Johnston S, Lindsay D, Sibley D, Trees A, Wouda W. (1997). Neosporosis. Report of the international *Neospora* workshop. *Parasitology* 19:120-126.
17. Bartels C, Wouda W, Schukken H. (1999). Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52:247-257.
18. 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 LM. (2006). Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet Parasitol* 137:17-27.
19. Basso W, Venturini L, Venturini MC, Moore DP, Rambeau M, Unzaga JM, Campero C, Bacigalupe D, Dubey JP. (2001). Prevalence of *Neospora caninum* infection in dogs from beef cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. *J Parasitol* 87: 906-907.
20. Baszler TV, Gay LJ, Long MT, Mathison BA. (1999). Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J Clin Microbiol* 37:4059-4064.
21. Bergeron N, Fecteau G, Billeneuve A, Girard C, Pare J. (2001). Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 97:145-152.
22. Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 70:271-274.
23. Björkman C, Holmdahl OJM, Uggla A. (1996). *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 208:1441-1443.
24. Björkman C, Johansson O, Stenlund S, Holmdahl OJM, Uggla A. (1998). An indirect enzyme linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet Parasitol* 75:252-260.
25. Björkman C, Uggla A. (1999a). Serological diagnosis of *Neospora caninum*, infection. *Int J Parasitol* 29:1497-1507.

26. Björkman C, Näslund K, Stenlund S, Maley SW, Buxton D, Uggla A. (1999b). An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *J Vet Diagn Invest* 11:41-44.
27. Björkman C, Alenius S, Emanuelsson U, Uggla A. (2000). *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. *Vet J* 159:201-6.
28. Björkman C, Gondim LFP, Näslund K, Trees AJ, McAllister MM. (2005). IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *Neospora caninum* oocysts. *Vet Parasitol* 128:195-200.
29. Bryan LA, Gajadhar AA, Dubey JP, Haines DM. (1994). Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. *Can Vet J* 35:111-113.
30. Buxton D, McAllister M, Dubey JP. (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol* 18:546-552.
31. Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA. (1998). *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet Rec* 143:228-229.
32. Canada N, Carvalheira J, Meireles CS, Correia da Costa JM, Rocha A. (2004). Prevalence of *Neospora caninum* infection in dairy cows and its consequences for reproductive management. *Theriogenology* 62:1229-35.
33. Chi J, VanLeeuwen JA, Weersink A, Keefe GP. (2002). Management factors related to seroprevalences to bovine viral diarrhoea virus, bovine-leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, and *Neospora caninum* in dairy herds in the Canadian Maritimes. *Prev Vet Med* 55:57-68.
34. 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.
35. Collantes-Fernandez E, Rodriguez-Bertos A, Arnaiz-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 a aborted bovine foetuses. *Theriogenology* 65:629-41.
36. Conrad PA, Sverlow KW, Anderson ML, Rowe JD, Bondurant R, Tuter G, Breitmeyer R, Palmer C, Thurmond M, Ardans AA, Dubey JP, Duhamel G, Barr BC. (1993). Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn Invest* 5:572-578.
37. Conrad, P.; Anderson, M.L.; Barr, B.C. (1995) Neosporosis: A Newly Recognized Cause Of Abortion In Dairy Cattle. Second Western Large Herd Dairy Management Conference. Las Vegas, NV. April 6-8, 62-68.
38. Corbellini, L.G.; Driemeier, D.; Cruz, C.F.E.; Gondim, L.F.P.; Wald, V. (2002). Neosporosis was a cause of aborto in dairy cattle in Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Vet Parasitol* 103:195-202.
39. Corbellini L, Smith D, Pescador C, Schmitz M, Correa A, Steffen D, Driemeier D. (2006). Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev Vet Med* 17:130-41.
40. Cramer G, Kelton D, Duffield TF, Hobson J, Lissemore K, Hietala S, Peregrine A. (2002). *Neospora caninum* serostatus and culling of Holstein cattle. *J Am Vet Med Assoc* 221:1165-1168.
41. Davison HC, Otter HC, Trees AJ. (1999). Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol* 29:1683-1689.

42. 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. *Res Vet Sci* 70:163-168.
43. del Campo J, Chavez A, Delgado A, Falcón N, Ornelas A, Casas E, Serrano E. (2003). Frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima. *Rev investig vet Perú* 14:145-149 ISSN 1609-9117.
44. 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. *Int J Parasitol* 29:1647-57.
45. Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wouda W, Barkema HW. (2001). Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol* 31:747-752.
46. Dijkstra T, Barkema H, Hesselink J, Wouda W. (2002). Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet Parasitol* 105:89-98.
47. Dubey JP, Carpenter J, Speer C, Topper M, Uggla A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 192:1269-1285.
48. Dubey JP, Lindsay DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, Thulliez P. (1996a). Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am J Vet Res* 57:329-335.
49. Dubey JP, Lindsay DS. (1996b). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 67:1-59.
50. Dubey JP. (1999a). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* 84:349-367.
51. Dubey JP. (1999b) Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J Am Vet Med Assoc* 214:1160-1163.
52. Dubey JP, Barr B, Barta J, Bjerkäs I, Björkman C, Blagburn B, Bowman D, Buxton D, Ellis J, Gottstein B, Hemphill A, Hill D, Howe D, Jenkins M, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh A, Mattson J, Mcallister M, Modrý D, Omata Y, Sibley L, Speer C, Trees A, Uggla A, Upton S, Williams D, Lindsay D. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol* 32:929-946.
53. Dubey JP, Zarnke R, Thomas N, Wong S, Van Bonn W, Briggs M, Davis J, Ewing R, Mense M, Kwok O, Romand S, Thulliez P. (2003a). *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals. *Vet Parasitol* 116:275-296.
54. Dubey JP. (2003b) Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 41:1-16.
55. Easton C, Paullier C, Bañales P, Repiso M, Herrera B. (2001). Aborto bovino: principales etiologías diagnosticadas por la DILAVE "Miguel C. Rubino". VII Congreso Nacional de Veterinaria, Noviembre 2001, Montevideo, Uruguay.
56. Estill C. (2004) *Neospora*-associated abortion and field experience with a commercial vaccine in a dairy herd. 23rd World Buiatrics Congress. July 11-16. Quebec City, Canada.
57. Fernandes BCTM, Gennari SM, Souza SLP, Carvalho JM, Oliveira WG, Cury MC. (2004). Prevalence of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs

- from urban, periurban and rural areas of the city of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 123:33-40.
58. Ferroglio E, Wamba E, Rossi L, Trisciuoglio A, De Meneghi D. (2003). Antibodies to *Neospora caninum* in wild mammals from Kenya, East Africa. *Vet Parasitol* 118:43-49.
 59. Fleiss JL. (1981). *Statisticals Methods for rates and proportions*. 2nd. Edition. John Wiley & Sons. ISBN 0-471-06428-9.
 60. French NP, Clancy D, Davison HC, Trees AJ (1999). Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int J Parasitol* 29:1691-1704.
 61. Gennari, SM, Yai LO, D'Auria SR, Cardoso SS, Kwok OC, Jenkins MC, Dubey JP. (2002). Occurrence of *Neospora caninum* Antibodies in Sera from Dogs of the City of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 106:177-179.
 62. Gondim L, Sartor I, Hasegawa M, Yamane I. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet Parasitol* 86:71-75.
 63. 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. *J Parasitol* 88:1159-1163.
 64. Gondim L, McAllister M, Mateus-Pinilla N, Pitt W, Mech L, Nelson M. (2004a). Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *J Parasitol* 90:1361-1365.
 65. Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. (2004b). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 34:159-161.
 66. Gondim LFP, McAllister MM, Gao L. (2005). Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Vet Parasitol* 134:33-39.
 67. Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thür B, Busato A, Stärk KDC, Müller N. (1999). Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int J Parasitol* 28:679-91.
 68. Graham, D.A.; Calvert, V.; Whyte, M.; Marks, J. (1999) Absence of serological evidence for human *Neospora caninum* infection. *Vet Rec* 144:672-673.
 69. 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 Parana state, Brazil. *Vet Parasitol* 124:1-8.
 70. Guy CS, Williams DJL, Kelly DF, McGarry JW, Guy F, Bjorkman 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. *Vet Rec* 149:443-449.
 71. Hall C, Reichel M, Ellis J. (2005). *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol* 128:231-241.
 72. Hässig M, Gottstein B. (2002). Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on Swiss dairy farms. *Vet Rec* 150:538-542.
 73. Hernandez J, Risco C, Donovan A. (2001). Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 219:632-635.

74. Hietala SK, Thurmond MC. (1999). Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int J Parasitol* 29:1669-76.
75. Hoar BR, Ribble CS, Spitzer CC, Spitzer PG, Janzen ED. (1996). Investigation of pregnancy losses in beef cattle herds associated with *Neospora* sp. infection. *Can Vet J* 37:364-366.
76. 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. *J Am Vet Med Assoc* 221:1160-1164.
77. 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. *Vet Parasitol* 127:177-188.
78. Hosmer DW, Lemeshow S. (2000). *Applied Logistic Regression*. 2nd Ed. Wiley-Interscience, New York. ISBN 0-471-35632-8.
79. Illanes O, Moore A, Pringle J, Saindon A. (1994). *Neospora*-induced congenital myelitis and polyradiculoneuritis in a one-month-old Holstein calf. *Can Vet J* 35:653-654.
80. Innes EA, Buxton D, Maley S, Wright S, Marks J, Esteban I, Rae A, Schock A, Wastling J. (2000). Neosporosis. Aspects of epidemiology and host immune response. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916:93-101.
81. Innes E, Wright S, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey I, Buxton D. (2001). Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 31:1523-1534.
82. Innes E, Andrianarivo A, Björkman C, Williams D, Conrad A. (2002). Immune response to *Neospora caninum* and prospect for vaccination. *Trends Parasitol* 18: 497-504.
83. Innes E, Wright S, Bartley P, Maley S, Macaldowie C, Esteban-Redondo I, Buxton D. (2005). The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Vet Immunol Immunopathol* 108:29-36.
84. Jenkins M, Baszler T, Björkman C, Schares G, Williams D. (2002). Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int J Parasitol* 32:631-636.
85. 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. *Prev Vet Med* 40:151-63.
86. Kashiwazaki Y, Giannechini RE, Lust M, Gil J. (2004). Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Vet Parasitol* 120:139-144.
87. Kim JH, Kang MS, Lee BC, Hwang WS, Lee CW, So BJ, Dubey JP, Kim DY. (2003). Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs and raccoon dogs in Korea. *Korean J Parasitol* 41:243-245.
88. Kyaw T, Suwimonteerabutr J, Virakul P, Lohachit C, Kalpravidh W. (2004). Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows, with a low rate of transplacental transmission. *Vet Parasitol* 131:145-150.
89. Landmann JK, Jillella D, O'Donoghue PJ, McGowan MR. (2002). Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. *Aust Vet J* 80:502-503.
90. Lasri S, De Meerschman F, Rettigner C, Focant C, Losson B. (2004). Comparison of three techniques for the serological diagnosis of *Neospora*

- caninum* in the dog and their use for epidemiological studies. *Vet Parasitol* 123:25-32.
91. Lindsay, D.S.; Dubey, J.P. (1993) *Neospora*-Induced protozoal abortions in cattle. *Comp Cont Educ Pract Vet* 15:882-888.
 92. Lindsay DS, Kelly EF, McKown RD, Stein FJ, Plozer J, Herman J, Biagburn BL, Dubey JP. (1996). Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in coyotes (*Canis latrans*) and experimental infections of coyotes with *Neospora caninum*. *J Parasitol* 82:657-659.
 93. Lindsay, D.S.; Dubey, J.P.; Duncan, R.B. (1999) Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 82:327-333.
 94. Lindsay DS, Ritter DM, Brake D. (2001). Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of *Neospora caninum*. *J Parasitol* 87:909-911.
 95. Lobato J, Silva DAO, Mineo TWP, Amaral JDH, Silva GR, Costa -Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR. (2006). Detection of Immunoglobulin G Antibodies to *Neospora caninum* in Humans: High Seropositivity Rates in Patients Who Are Infected by Human Immunodeficiency Virus or Have Neurological Disorders. *Clin Vaccine Immunol* 13:84-89.
 96. Lopez-Gatius F, Pabon M, Almeria S. (2004). *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology* 62:606 -13.
 97. Lopez-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. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52:51-53.
 98. Mainar-Jaime RC, Thurmond MC, Berzal-Herranz B, Hietala SK. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in northern Spain. *Vet Rec* 145:72-75.
 99. Maley S, Buxton D, Rae A, Wright S, Schock A, Bartley P, Esteban -Redondo I, Swales C, Hamilton C, Sales J, Innes E. (2003). The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. *J Comp Pathol* 129:186-195.
 100. McAllister MM, Huffman EM, Hietala SK, Conrad PA, Anderson ML, Salman MD. (1996). Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J Vet Diagn Invest* 8:355 - 357.
 101. McAllister MM, Jolley WR, Wills RA, Lindsay DS, McGuire AM, Tranas JD. (1998a) Oral inoculation of cats with tissue cysts of *Neospora caninum*. *Am J Vet Res* 59:441-444.
 102. McAllister MM; Dubey JP; Lindsay DS; Jolley WR; Wills RA; McGuire AM. (1998b). Dogs as the definitive host of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 28:1473-1478.
 103. 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. *J Am Vet Med Assoc* 217:881 -887.
 104. McAllister, MM. (2001). Do cows protect fetuses from *Neospora caninum* transmission? *Trends Parasitol* 17:6.
 105. McAllister D, Latham S. (2002). *Neospora* 2001. *Trends Parasitol* 18: 4 -5.
 106. McGuire AM, McAllister M, Wills RA, Tranas JD. (1999). Experimental inoculation of domestic pigeons (*Columbia livia*) and zebra finches

- (*Poephilia guttata*) with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int J Parasitol* 29:1525-9.
107. Melo CB, Leite RC, Lobato ZIP, Leite RC. (2004). Infection by *Neospora caninum* associated with bovine herpesvirus 1 and bovine viral diarrhoea virus in cattle from Minas Gerais State. *Brazil Vet Parasitol* 119:97-105.
 108. Moen AR; Wouda W; Mul MF; Graat EAM; van Werven T. (1998) Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. *Theriogenology* 49:1301-1308.
 109. Moore D, Odeón A, Campero C. (2001). Neosporosis bovina: una actualización. *Vet Arg* 18:752-775.
 110. Moore D, Campero C, Odeón A, Posso M, Cano D, Leunda M, Basso W, Venturini M, Späth E. (2002). Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet Parasitol* 107:303-316.
 111. Moore DP, Campero CM, Odeon AC, Chayer R, Bianco MA. (2003). Reproductive Losses due to *Neospora caninum* in a Beef Herd in Argentina. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 50:304-308.
 112. Moore D, Leunda M, Zamorano P, Odeón A, Romera S, Cano A, De Yaniz G, Venturini M, Campero C. (2005a). Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet Parasitol* 130:29-39.
 113. Moore D. (2005b). Fate of *Neospora*-seropositive animals: An opinion. *Parasitol Latinoam* 60:192-195. ISSN 0717-7712.
 114. Moore D.P. (2005c). Neosporosis in South America. *Vet Parasitol* 127:87-97.
 115. Morales E, Trigo FJ, Ibarra F, Puente E, Santaacruz M. (2001) Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. *J Vet Diagn Invest* 13:413-415.
 116. 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. *Arq Bras Med Vet Zootec* 57:312-316.
 117. Omata Y, Kano R, Masukata Y, Kobayashi Y, Igarashi M, Maeda R, Saito A. (2005). Development of *Neospora caninum* cultured with human serum in vitro and in vivo. *J Parasitol* 91:222-225.
 118. Osawa T, Wastling J, Acosta L, Ortellado C, Ibarra J, Innes E. (2002). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay. *Vet Parasitol* 110:17-23.
 119. Otranto D, Llazarri A, Testini G, Traversa D, Frangipane di Regalbano A, Badan M, Capelli G. (2003). Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet Parasitol* 118:7-18.
 120. Ould-Amrouche A, Klein F, Osdoit C, Mohammed HO, Touratier A, Sanaa M, Mialot J-P. (1999). Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet Res* 30:531-538.
 121. Pan Y, Jansen GB, Duffield TF, Hietala S, Kelton D, Lin CY, Peregrine AS. (2004). Genetic Susceptibility to *Neospora caninum* Infection in Holstein Cattle in Ontario. *J Dairy Sci* 87:3967-3975.
 122. Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. (1996) Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res* 60:133-139.

123. Pare J, Thurmond MC, Hietala SK. (1997). *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. J Parasitol 83:82-87.
124. Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. (1998). Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. J Am Vet Med Assoc 213:1595-1598.
125. Patitucci A, Pérez M, Luders C, Ratto M, Dumont A. (1999). Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en rebaños lecheros del sur de Chile. Arch Med Vet 31:215-218.
126. Patitucci A, Pérez M, Israel K, Rozas M. (2000). Prevalencia de anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en dos rebaños lecheros de la IX Región de Chile. Arch Med Vet 32: 209-214.
127. Patitucci A, Pérez M, Rozas M, Israel K. (2001). Neosporosis canina: Presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. Arch Med Vet 33:227-232.
128. Peregrine AS, Duffield TF, Wideman G.(2004). Udder health in dairy cattle infected with *Neospora caninum*. Prev Vet Med 64:101-12.
129. Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozaolo A, Seijas-Carballedo A, Costas E, Ortega-Mora LM. (2000). Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations. In: Hemphill A, Gottstein B. A European perspective on *Neospora caninum*. Int J Parasitol 30:906-909.
130. Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozaolo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora L. (2003). Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. Vet Parasitol 111:143-152.
131. Peters M, Lütkefels E, Heckerroth A, Schares G. (2001). Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. Int J Parasitol 31:1144-1148.
132. Petersen E, Lebech M, Jensen L, Lind P, Rask M, Bagger P, Björkman C, Ugglå A. (1999). *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. Emerg Infect Dis 5:278-280.
133. Pfeiffer DU, Williamson NB, Reichel MP, Wichtel JJ, Teague WR. (2002). A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. Prev Vet Med 54:11-24.
134. Piergili D, Pasquali P, Diaferia M, Mangili V, Rosignoli L. (2003). *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50:399-404.
135. Quintanilla-Gozaolo A, Pereira-Bueno J, Tabarés E, Innes EA, González-Paniello R, Ortega-Mora LM. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. Int J Parasitol 29:1201-8.
136. Reichel MP. (1998). Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. NZ Vet J 46:38.
137. Repiso MV, Gil A, Bañales P, D'Anatro N, Fernández L, Guarino H, Herrera B, Núñez A, Olivera M, Osawa T, Silva M. (2005) Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría del Uruguay. Veterinaria 40:5-28.

138. Romero JJ, Pérez E, Dolz G, Frankena K. (2002). Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev Vet Med* 53:263-73.
139. Romero J J, Pérez E, Frankena K. (2004). Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions. *Vet Parasitol* 123:149-59.
140. Sánchez GF, Morales SE, Martínez MJ, Trigo JF. (2003). Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. *Can J Vet Res* 67:142-145.
141. Sanderson MS, Gay JM, Baszler TV. (2000). *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. *Vet Parasitol* 90:15-24.
142. Sawada M, Park CH, Kondo H, Morita T, Shimada A, Yamane I, Umemura T. (1998). Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. *J Vet Med Sci* 60:853-4.
143. Schares G, Peters M, Wurm R, Barwald A, Conraths FJ. (1998). The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol* 80:87-98.
144. Schares G, Rauser M, Zimmer K, Peters M, Wurm R, Dubey JP, de Graaf DC, Edelhofer R, Mertens C, Hess G, Conraths FJ. (1999). Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *J Parasitol* 85:688-694.
145. Schares G, Heydorn A, Cüppers A, Conraths F, Mehlhorn H. (2001). Cyclic transmission of *Neospora caninum*: serological findings in dogs shedding oocysts. *Parasitol Res* 87: 873-877.
146. Schares G, Bärwald A, Staubach C, Ziller M, Klöss D, Schröder 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.
147. Schares G, Pantchev N, Barutzki D, Heydorn AO, Bauer C, Conraths FJ. (2005). Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany . *Int J Parasitol* 35:1525-1537.
148. Scheaffer RL, Mendenhall W, Ott L. (1987). Elementos de muestreo. Grupo Editorial Iberoamérica S.A. de C.V. ISBN 968-7270-20-9.
149. Schock A, Innes EA, Tamane I, Latham SM, Wastling JM. (2001). Genetic and biological diversity among isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology* 123:13-23.
150. Söndgen P, Peters M, Bärwald A, Wurm R, Holling F, Conraths F, Schares G. (2001). Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet Parasitol* 102:279-290.
151. Stata Corp. (2003). Stata Statistical Software: release 8.2. STATA Corporation, College Station, TX, USA.
152. Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Ugglå A, Bjorkman C. (1999). Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parsitol* 85:227-234.
153. Stoessel Z, Taylor LF, McGowan MR, Coleman GT, Landmann JK. (2003). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* within central Queensland beef cattle. *Aust Vet J* 81:165-166.

154. Thilsted JP, Dubey JP. (1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1:205-209.
155. Thurmond MC, Anderson ML, Blanchard PC. (1995). Secular and seasonal trends of *Neospora* abortion in California dairy cows. *J Parasitol* 81:364-367.
156. Thurmond MC, Hietala SK. (1996). Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am J Vet Res* 57:1559-1562.
157. Thurmond MC, Hietala SK. (1997a). Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am J Vet Res* 58:1381-1385.
158. Thurmond MC, Hietala SK. (1997b). Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 210:672-674.
159. Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. (1997c). Herds-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortions in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diagn Invest* 9:44-49.
160. Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. (1999). Predictive values of fetal histopathology and immunoperoxidase staining in diagnosing bovine abortion caused by *Neospora caninum* in a dairy herd. *J Vet Diagn Invest* 11:90-94
161. Tranas J, Heinzen R, Weiss L, Mcallister M. (1999). Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin Diagn Lab Immunol* 765-767.
162. Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM. (1999). Towards evaluating the economic impact of bovine Neosporosis. *Int J Parasitol* 29:1195-1200.
163. Trees AJ, Williams DJL. (2005). Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol* 21:558-561.
164. Uggl A, Stenlund S, Holmdahl OJM, Jakubek EB, Thebo P, Kindahl H, Björkman C. (1998). Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int J Parasitol* 28:1467-72.
165. Venturini, M.C.; Venturini, L.; Bacigalupe, D.; Machuca, M.; Echaide, I.; Basso, W.; Unzaga, J.M.; Di Lorenzo, C.; Guglielmone, A.; Jenkins, M.C.; Dubey, J.P. (1999) *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int J Parasitol* 29:1705-1708.
166. von Blumröder D, Schares G, Norton R, Williams DJL, Esteban-Redondo I, Wright S, Björkman C, Frössling J, Risco-Castillo V, Fernández-García V, Ortega-Mora LM, Sager H, Hemphill A, van Maanen g C, Wouda W, Conraths FJ. (2004). Comparison and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet Parasitol* 120:11-22.
167. Waldner CL, Janzen ED, Ribble CS. (1998). Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *J Am Vet Med Assoc* 213:685-690.
168. Waldner CL. (2002). Precolostral antibodies to *Neospora caninum* in beef calves following an abortion outbreak and associated fall weaning weights. *Bov Pract* 36:81-5.
169. Waldner C, Wildman B, Hill B, Fenton RK, Pittman T, Schunicht O, Jim GK, Guichon T, Booker C. (2004). Determination of the seroprevalence of *Neospora caninum* in feedlot steers in Alberta. *Can Vet J* 45:218-224.

170. 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* 121:347-358.
171. Williams D, Guy C, Smith R, Guy F, McGarry J, McKay J, Trees A. (2003). First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* 33:1059-1065.
172. Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. (1997a). Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J Parasitol* 83:545-547.
173. Wouda W, Moen AR, Visser IF, van Knapen F. (1997b). Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *J Vet Diagn Invest* 9:180-185.
174. Wouda W, Moen AR, Schukken YH. (1998). Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49:1311-1316.
175. Wouda W, Bartels C, Moen A. (1999a). Characteristics of *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52:233-245.
176. Wouda W, Dijkstra T, Kramer A, MH, Maanen C, van Brinkhof J M. (1999b) Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol* 29:1677-1682.
177. Wouda W, Bartels CJM, Dijkstra T. (2000). Epidemiology of bovine neosporosis with emphasis on risk factors. In: Hemphill A, Gottstein B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 30:884-886.
178. Wu J, Dreger S, Chow E, Bowlby E. (2002). Validation of 2 commercial *Neospora caninum* antibody enzyme linked immunosorbent assay. *Can J Vet Res* 66:264-271.
179. Yaeger MJ, Shawd-Wessels S, Leslie-Steen P. (1994). *Neospora* abortion storm in a Midwestern dairy. *J Vet Diagn Invest* 6:506-508.

MANEJO SANITARIO

CUANDO NO SE ESPECIFIQUE OTRA COSA LAS PREGUNTAS SE REFIEREN AL ÚLTIMO AÑO.

15. De las siguientes enfermedades quisiéramos saber si existen en su establecimiento, si vacuna y si alguna de estas enfermedades le preocupan por su posible efecto sobre la Producción

Enfermedad	Presencia	Fecha de última Vacunación	Preocupa
BVD			
IBR			
Leptospirosis			
Clostridiosis			
Mancha			
Campilobacter			
Trichomona			
Carbunco			
Queratoconjuntivitis			
Tristeza			
Leucosis			
Otras=			

16. ¿Presenta otro tipo de problema sanitario?
 ¿Cuál? _____

BIOSEGURIDAD

17. Indique cuales de los siguientes animales tienen contacto físico con las vacas, alimentos (pasturas) y el agua.

Perros	<input type="checkbox"/>	Carpinchos	<input type="checkbox"/>
Zorros	<input type="checkbox"/>	Bovinos de carne	<input type="checkbox"/>
Gatos	<input type="checkbox"/>	Ovinos	<input type="checkbox"/>
Roedores	<input type="checkbox"/>	Cabras	<input type="checkbox"/>
Liebres	<input type="checkbox"/>	Ciervos	<input type="checkbox"/>
Aves Domésticas	<input type="checkbox"/>	Cerdos	<input type="checkbox"/>
Equinos	<input type="checkbox"/>	Comadreas	<input type="checkbox"/>

18. Indique si se produce el ingreso de los siguientes animales a los depósitos de alimentos (galpones)

Perros	<input type="checkbox"/>
Zorros	<input type="checkbox"/>
Pájaros	<input type="checkbox"/>
Roedores	<input type="checkbox"/>
Otros carnívoros	<input type="checkbox"/>

19. ¿Qué medidas toma con las placentas, fetos y otro residuos?

20. Perros y zorros, ¿ tienen contacto con dichos residuos?

SI	<input type="checkbox"/>
NO	<input type="checkbox"/>

21. ¿Posee algún tipo de instalación destinada al almacenamiento de los alimentos?¿Cuál?

22. Sobre los depósitos en los que almacena alimentos (ración, reservas, etc.):

poseen algún sistema que evite el ingreso de animales (aves, roedores)

los perros tienen libre acceso _____

se realiza limpieza _____

23. Sobre los depósitos de agua:

poseen tapa

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

se realiza limpieza

24 ¿Ha introducido bovinos de carne o le che desde otro establecimiento en el último año?

SI	<input type="checkbox"/>	Carne	<input type="checkbox"/>	¿Cuántos?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
NO	<input type="checkbox"/>	Leche	<input type="checkbox"/>					

25 ¿Cuando introduce un animal exige alguna medida sanitaria? ¿Cuál?

REFUGOS Y REEMPLAZOS

26. Nro Vacas Refugadas en el último año:

27, ¿Cuáles son las principales causas de refugo?

28. Dentro de las patologías reproductivas, cuáles son las principales causantes de refugo?

repetición de celos

abortos

otra, ¿Cuál?

<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>

MANEJO REPRODUCTIVO

29. Su servicio es con:

- I.A. Semen Nac
- I.A. Semen Imp
- Monta Campo
- Monta Corral

30. De los Indicadores Reproductivos que conozca indique su valor en días:

- Intervalo Inter-parto
- Parto-Primer Celos
- N servicios/preñez

31. Realiza diagnóstico de preñez con

Palpación Rectal, Ecografía, No realiza

32. Con que Frecuencia realiza diagnóstico de preñez:

- Mensual
- Estacional

PRODUCCIÓN

33. Identificación:

- Individual
- Caravanas
- Mej. Genético
- Tatuaje
- Otro, Cual? _____

34. Tipo de Registros:

- Planilla
- Mejor. Lechero
- Con Computadora
- Otro: Cual? _____

35. Hace Control Lechero:

- SI
- NO

Información sobre prácticas de Manejo y Producción

36. Producción en litros promedio Vaca/día
Lactancia

37. Utiliza pool de calostro en la alimentación de los terneros?

- SI
- NO

38. Emplea nodrizas para la crianza de terneros?

- SI
- NO

SISTEMA DE CRÍA DE REEMPLAZOS

39. ¿cuántos terneros nacieron durante el último año?

Total	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>							Vivos	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>						
Hembras	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>							Muertos	<table border="1"><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table>						

40. ¿Las terneras van al campo de recría? a que edad se van _____

¿A qué campo de recría? _____

41. Al momento actual cuantas de las vacas han:

- Nacido y criadas en el tambo
- Nacido aquí y recriadas fuera
- Nacido fuera del tambo

42. ¿Cuántos terneros han presentado síntomas nerviosos y cuántos mueren por esta razón?

Sobre la Enfermedad

43. ¿Conoce la Neosporosis? SI NO

44. ¿Han habido diagnósticos de esta enfermedad? _____

45. ¿Cuántos de los siguientes casos se han presentado en su establecimiento el último año?

abortos en vacas	<input type="checkbox"/>	
edad gestacional de los abortos	<input type="checkbox"/>	
signos neuromusculares en terneros	<input type="checkbox"/>	¿Cuáles? _____
aborto en perras	<input type="checkbox"/>	
signos neuromusculares en perros (cachorros)	<input type="checkbox"/>	¿Cuáles? _____

46. ¿Existen zorros en su establecimiento?

SI <input type="checkbox"/>	¿Representan un problema en su predio? _____
NO <input type="checkbox"/>	

CUESTIONARIO Muestreo Caninos

- 1) Código: _____ 2) Propietario: _____
- 3) Veterinario: _____ 4) Encuestado: _____
- 5) Fecha: __ / __ / __ 6) Número de DICOSE:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
- 7) Teléfono: _____ 8) Nº de vacas: Ordeño _____ Secas _____
- 9) ¿Conoce la Neosporosis? SI
NO
- 10) ¿Ha tenido diagnóstico de esta enfermedad? SI
NO _____
- 11) ¿Cuántos de los siguientes casos se han presentado en el último año en su predio?
- 11.1) abortos en vacas _____ edad gestacional de los abortos _____
- 11.2) signos nerviosos en terneros _____ ¿Cuáles? _____
- 11.3) aborto en perras _____
- 11.4) signos nerviosos en cachorros _____ ¿Cuáles? _____
- 12) ¿Cuántos perros hay en su establecimiento?

--	--
- 13) ¿Existen zorros en el predio? SI
NO
- 14) Sobre los depósitos en los que almacena alimentos (ración, reservas, etc.):
- 14.1) poseen algún sistema que evite el ingreso de animales (aves, roedores) _____
- 14.2) los perros tienen libre acceso _____
- Observaciones: _____

- Encuestador: _____

FORMULARIO DE TOMA DE MUESTRAS - CANINOS

Establecimiento _____ Código _____

Fecha de recolección ___ / ___ / ___

Veterinario actuante _____

muestra	RESEÑA DEL ANIMAL				Hembras		Antecedentes	Obs
	Nombre	Raza	Sexo	Edad	Nº cam.	Abortos	Probl. nerviosos	
Nº	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

Referencias:

- A** Nombre del animal u otra forma de identificación
- B** Nombre de la raza a la que pertenece
- C** M en machos; H en hembras
- D** Indicar edad aproximada del animal en años o meses
- E** Indicar el número de camadas (partos) que ha tenido la perra y si existieron alteraciones expresarlas en Observaciones
- F** Indicar si la perra presentó problemas de aborto y sus características
- G** Indicar si los animales (sobre todo cachorros) presentaron síntomas nerviosos y expresar sus características en Observaciones
- H** Referir las observaciones de los items anteriores