



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Validando métodos de diagnósticos serológicos y moleculares para la detección de *Neospora caninum* en ganado bovino

Tesina de grado
Licenciatura en Ciencias Biológicas

Tatiana Hundewadt

Tutor: Dr. Andrés Cabrera
Co-tutora: Msc. Soledad Echeverría

Laboratorio Interacciones Hospedero Patógeno
Instituto Pasteur de Montevideo
Facultad de Ciencias, Universidad de la República
Montevideo, Uruguay

Agradecimientos

A mis padres, que me han apoyado desde los inicios de mi carrera y han sido parte de este largo camino. Gracias por estar ahí cuando los precisé, por cubrirme las espaldas, por ayudarme a acomodar horarios y poder seguir estudiando.

A vos amor, un párrafo dedicado solo para ti, que estás siempre, que me bancas en mis locuras, en mi pasión, que sos un pilar fundamental. Gracias por tanto, por toda tu ayuda, por bancar mi frustración, mis noches sin dormir, mis nervios pre parciales/exámenes. Gracias por ayudarme tanto con el excel, con la edición de imágenes. Gracias por acompañarme en esos días en que el miedo ganaba y precisaba de tu mano y compañía para ir a dar un parcial. Gracias, gracias y más gracias. No hay palabras suficientes para expresar todo lo que ha significado tu apoyo en toda mi carrera. Fue una hermosa coincidencia cruzarme contigo en Fcien, ya una segunda casa, donde compartimos tanto y vivimos tanto. Formamos una familia hermosa, con una hija tan fanática por los bichos y por saber por qué como nosotros. Gracias a vos Claris por aguantar mis ausencias, por acompañarme, por querer ser parte también de esta faceta de mi vida, por querer saber qué hago o qué estoy estudiando, cómo me fue en un examen o qué fue lo que obtuvimos de resultados de un ensayo. Gracias amor y Claris por recibirme siempre con una sonrisa cuando vuelvo a casa, por alegrarse de mis logros y por apoyarme en las no tan buenas, por ser parte de mi vida y estar ahí siempre. Los amo.

A mis amigas, que también tuve el privilegio de coincidir en la facultad y de formar un vínculo hermoso. Nada hubiera sido lo mismo sin ustedes, miles de horas compartidas en clase, de estudio en la biblioteca, de casas invadidas para preparar un parcial. Gracias Sole, amiga querida, por la oportunidad que me diste de poder realizar la pasantía contigo. Ha sido hermoso poder terminar la licenciatura así, juntas otra vez, como en el inicio.

Gracias a todos en el Laboratorio Interacciones Hospedero Patógeno del Instituto Pasteur de Montevideo que me recibieron de la mejor manera y me hicieron sentir más que bienvenida. Gracias Andrés por la oportunidad de ser tu pasante y de todo lo aprendido.

Tabla de contenidos

Resumen.....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Pérdidas económicas por Neospora caninum.....	6
1.2 Historia.....	8
1.3 Taxonomía.....	11
1.4 Estadíos en el ciclo biológico.....	11
1.5 Ciclo biológico de N. caninum.....	13
1.6 Signos clínicos y epidemiología.....	17
1.7 Variabilidad genética y fenotípica.....	19
1.8 Inmunidad y antígenos.....	22
1.9 Diagnóstico.....	24
1.10 Control y prevención.....	27
2. Objetivos.....	29
2.1 Objetivo general.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
2.2.1 Objetivo específico 1.....	29
2.2.2 Objetivo específico 2.....	29
2.2.3 Objetivo específico 3.....	29
2.2.4 Objetivo específico 4.....	30
3. Materiales y métodos.....	31
3.1 Muestras.....	31
3.2 Diagnóstico molecular.....	33
3.2.1 PCR a tiempo final.....	33
3.2.2 Electroforesis en gel de agarosa 1%.....	34
3.2.3 Microsatélites.....	34
3.2.4 Análisis de secuencias de microsatélites.....	35
3.3 Diagnóstico serológico.....	35
3.3.1 ELISA in house indirecto.....	36
3.3.2 Análisis estadístico.....	36
3.3.3 Western Blot.....	37
4. Resultados.....	38
4.1 Resultados de los análisis moleculares.....	38
4.1.1 PCR a tiempo final.....	38
4.1.2 Microsatélites.....	41
4.2 Resultado de los análisis serológicos.....	46
4.2.1 Determinación de valor de cut-off.....	46
4.2.2 Análisis de sueros.....	47
5. Discusión.....	55
6. Conclusiones.....	60
7. Perspectivas.....	61
8. Bibliografía.....	63
ANEXOS.....	76

ANEXO 1.....	76
ANEXO 2.....	80
ANEXO 3.....	82
ANEXO 4.....	84

Resumen

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria causada por *Neospora caninum* (*N. caninum*), un protozooario intracelular obligado responsable de abortos en bovinos. Las altas tasas de aborto, mortalidad e infertilidad en el ganado, da como resultado grandes pérdidas económicas para las industrias de carne y lácteos, conosciéndose esta enfermedad como la enfermedad del billón de dólares.

El ciclo de vida de *N. caninum* se caracteriza por ser heteroxeno facultativo, involucrando un hospedador cánido definitivo, donde ocurre la replicación sexual y una gama de hospedadores intermediarios donde tiene lugar la replicación asexual (bovinos, caballos, ovejas, ciervos). El hospedador definitivo elimina ooquistes a través de las heces contaminando así el alimento del ganado y por ende infectando al mismo. La transmisión vertical (de madre a hijo) es la principal vía de contagio de los bovinos.

El objetivo del presente trabajo es evaluar métodos serológicos y moleculares, para el diagnóstico de *N. caninum* en muestras de suero y citobrush de ganado bovino lechero y cárnico. Un total de 306 vacas/vaquillonas de 13 predios de 9 departamentos de Uruguay se testearon por PCR y ELISA *in house* desarrollado en el Laboratorio Interacciones Hospedero-Patógeno del Instituto Pasteur de Montevideo. La seroprevalencia para bovinos de carne detectada fue de 12,2% (IC_{95%}: 5,8-19,3%) a nivel de animales y 66,67% a nivel de predios. Para bovinos de tambo, la seroprevalencia fue de 28%. ADN de *N. caninum* se detectó en 15% de las muestras de citobrush de vacas abortadas, analizadas por PCR (23 de 153 muestras, IC_{95%}: 10,2 - 21,5%). La prevalencia a nivel de rodeos cárnicos fue de 77,8% (7 de 9 predios). La neosporosis continúa siendo una enfermedad endémica en nuestro país.

1. Introducción

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria causada por *Neospora caninum* (fig. 1), un protozooario intracelular obligado del filo *Apicomplexa*, que es responsable de abortos en bovinos. Esta enfermedad constituye una de las principales causas de aborto en ganado, con un impacto económico significativo en la industria ganadera, tanto a nivel mundial como en nuestro país, donde la producción bovina es una de las principales fuentes de divisas (Piaggio, J., et al, 2007). Los abortos en un rodeo pueden ocurrir con diferentes patrones, entre ellos epidémicos, también conocidos como tormentas de abortos. A su impacto económico sobre la producción, se agregan importantes trastornos y muerte en animales de compañía (Reichel et al., 2013).

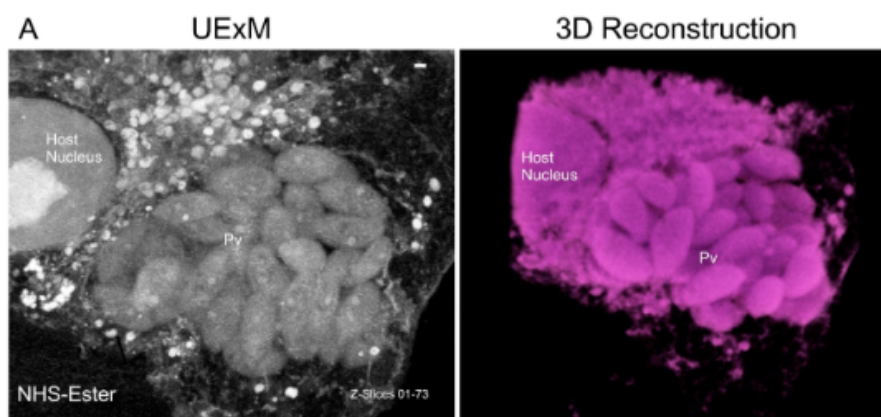


Figura 1. Microscopía de expansión de ultraestructura de vacuola parasitófora (Pv) de *N. caninum*. Tomado de Tomasina et al., 2023.

1.1 Pérdidas económicas por *Neospora caninum*

En nuestro país, se ha encontrado una amplia difusión de *N. caninum* tanto en establecimientos lecheros como en los rodeos de carne, siendo uno de los principales agentes hallados en los diagnósticos de aborto bovino que realiza en forma rutinaria la Dirección de Laboratorios Veterinarios (DILAVE, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). La importancia de la enfermedad radica en las pérdidas directas ocasionadas por los abortos. La tasa de procreo constituye una de las mayores limitantes para el crecimiento sostenido de la producción de carne vacuna al que nos desafía el aumento de las exportaciones. Otras pérdidas incluyen la posible disminución de la producción de leche en vacas seropositivas, muerte fetal temprana, mortalidad neonatal,

infertilidad, alargamiento de los períodos interpartos, reducción de los animales de reemplazo (Piaggio, J., et al, 2007).

El sector agropecuario representa entre el 6% y el 7% del PIB en Uruguay (2019-2022). Al incluir los subsectores e industrias asociadas, se lo suele denominar sector agroindustrial y su contribución es entre 14% y 16% del PIB (2019-2022). La agroindustria, además de su participación directa, genera efectos positivos sobre otros sectores, con encadenamientos hacia atrás (por una mayor demanda de servicios de transporte, almacenamiento, producción de insumos, telecomunicaciones, etc.) y hacia delante (gran parte de la producción agroindustrial nacional sirve de insumo para otras industrias). La producción bovina es el sector que genera la mayor cantidad de divisas para nuestro país, siendo la carne bovina uno de los productos de mayor peso y el motor principal de las exportaciones de Uruguay. El sector agropecuario y agroindustrial en su conjunto, del cual la producción bovina es un pilar, representa aproximadamente el 80% de las ventas totales de bienes del país. La ganadería bovina es una parte sustancial de esa contribución al PIB (entre 6% y 8% directamente, y hasta 12-16% con la cadena agroindustrial) y la generación de empleo (Uruguay XXI, 2024).

A pesar de su importancia sociocultural y económica, la ganadería lechera en Uruguay no ha experimentado un aumento significativo en el número de cabezas de ganado en las últimas décadas, debido en parte a la baja eficiencia reproductiva y a un alto riesgo de mortalidad de terneros. *N. caninum* es uno de los principales patógenos abortivos en el ganado lechero; sin embargo, las pérdidas económicas causadas por la neosporosis en Uruguay se han estimado, mas siguen sin ser calculadas. Un estudio realizado con datos sobre abortos asociados a neosporosis que ocurrieron en 2018 en Uruguay, tuvo como objetivo evaluar las pérdidas económicas anuales directas para el sector lechero primario (productores lecheros) debido a los abortos resultantes de la neosporosis bovina en el rodeo uruguayo. Se utilizó un modelo bioeconómico ajustado para estimar las pérdidas económicas por abortos tempranos (segundo trimestre de gestación) o tardíos (tercer trimestre de gestación). La pérdida económica promedio por aborto debido a la neosporosis fue de US\$ 868 (rango 605–1.162) si la vaca abortada permanecía en el rebaño sin abortos adicionales a lo largo de su vida productiva, y de US\$ 1.866 (rango 782–2.825) si la vaca era descartada después del aborto. Las pérdidas económicas estimadas para el sector primario debido a los abortos ocurridos en 2018 totalizaron casi US\$ 12 millones, lo que se atribuye a la

pérdida de crías, la lactancia retrasada, la reducción de la vida productiva (menos días en producción de leche/días de vida) y el descarte temprano. Estas pérdidas estimadas reflejan solo el sector primario, excluyendo los sectores secundario (industrial) y terciario (servicios). En términos físicos, los abortos asociados con la neosporosis causaron una pérdida total de 62 millones de litros de leche, lo que representa el 3.3% del volumen industrializado anualmente en el país. Las pérdidas estimadas no tuvieron en cuenta las ganancias perdidas por los productores lecheros de la producción de carne (es decir, la cría, engorde y venta para faena de terneros machos de razas lecheras perdidos debido a la neosporosis), ni ninguna pérdida indirecta (por ejemplo, la pérdida de mérito genético, el crecimiento atrofiado del hato lechero nacional, etc.). Esta información puede ser utilizada por los productores, veterinarios y formuladores de políticas para evaluar la relación costo-beneficio de implementar estrategias de control y prevención de la neosporosis bovina tanto a nivel de finca como a nivel nacional (Carrillo Parraguez et al., 2025).

En Estados Unidos, se han estimado las pérdidas económicas debido a la neosporosis bovina en billones de dólares, y se estiman cientos de millones de dólares en países sudamericanos como Argentina o Brasil (Carrillo Parraguez et al., 2025). Debido a la carga que supone para la economía mundial, la neosporosis es conocida como la enfermedad del billón de dólares (Reichel et al., 2013).

Un meta análisis realizado en 2019, sostiene que el principal impacto económico como resultado de la neosporosis bovina son los efectos negativos en la performance reproductiva de las hembras, y su disminución en la producción de leche del ganado lechero. A escala global, los abortos inducidos por *N. caninum* causan pérdidas anuales estimadas en más de US\$ 1.298 billones, dos tercios de los cuales son incurridas por la industria láctea y un tercio por la industria cárnica (Ribeiro et al., 2019).

1.2 Historia

El parásito *Neospora caninum* fue descubierto en 1984 por Bjerkas y colaboradores, y se lo vinculó inicialmente a perros que presentaban sintomatología nerviosa, y fue confundido con el parásito *Toxoplasma gondii* por formar el mismo tipo de quiste y estructura visualizada al microscopio óptico (Bjerkås et al., 1984). Posteriormente, se identificó el mismo agente asociado a encefalomiелitis en terneros

neonatos (Parish et al., 1987). En 1988, Dubey y colaboradores proponen describir la nueva especie como *Neospora caninum*, generando un nuevo género *Neospora*, tras identificar el parásito en perros que presentaban la misma sintomatología clínica que describieron Bjerkas y colaboradores. Antes de 1984, *N. caninum* estaba erróneamente identificado como *Toxoplasma gondii*. Los reportes de Bjerkas et al. en 1984 y Dubey et al. en 1988 sobre un parásito similar en perros, y lo denominaron *N. caninum*, tenían tres caracteres, basados en la información disponible, que lo diferenciaban de *T. gondii* y coccidios relacionados. En primer lugar, la entidad clínica con parálisis, especialmente de las extremidades traseras, era un síndrome no observado en otras especies diagnosticadas con toxoplasmosis. En segundo lugar, los quistes tisulares de este parásito presentaban una morfología distinta. En tercer lugar, no se detectaron anticuerpos contra *T. gondii* en estos perros y los parásitos no reaccionaron a los anticuerpos contra *T. gondii* en las pruebas inmunohistoquímicas. Se propuso la creación de un nuevo género para acomodar la especie *N. caninum* porque se consideraba que el parásito no clasificaba dentro los géneros existentes (Dubey et al., 2002).

En 1989, en una granja en Nuevo México, Estados Unidos, se identificó por primera vez a este patógeno como agente causante de abortos en vacas lecheras (Thilsted & Dubey, 1989). Posteriormente la infección por este parásito se asoció a las pérdidas reproductivas ocasionadas en ganado bovino en varios países (Dubey & Lindsay, 1996a). En 1992, se comprueba la transmisión vertical en la especie bovina (Dubey et al., 1992) y en 1993, se obtiene el primer aislado de *N. caninum* a partir de un feto bovino (Conrad et al., 1993). Se han realizado numerosos estudios de prevalencia de la infección en diversas regiones del mundo, pasando a considerarse la neosporosis como una de las principales causas de aborto bovino en el mundo (Dubey et al., 2007).

En Uruguay, se evidenció por primera vez la circulación de *N. caninum* en 1997, mediante la detección de anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta de muestras de perros (Barber et al., 1997a). Posteriormente, se reportó la presencia del parásito en fetos abortados bovinos en 1999 por inmunohistoquímica y técnicas serológicas (Bañales et al., 1998). Desde ese momento la neosporosis se diagnostica rutinariamente. En 1999 y 2000, el 37% de los fetos bovinos abortados enviados al DILAVE fueron confirmados para *N. caninum*. Un estudio seroepidemiológico en

establecimientos lecheros reportó una seroprevalencia de *N. caninum* de 60 % tras examinar muestras de suero con IFAT (indirect fluorescent antibody test) (Kashiwazaki et al., 2004). Siendo dicha publicación el primer reporte de aborto bovino asociado a *N. caninum*. Posteriormente, Bañales et al., 2006 reportaron seropositividad de rebaños de bovinos de carne de todo el país tras analizar sueros para la presencia de anticuerpos IgG anti *N. caninum*. A nivel de rebaños, el 73,8% de los analizados tenían animales seropositivos. A nivel individual, la seroprevalencia fue de 13,6% para vacas y 12,9% para vaquillonas.

En 2019, se aislaron y tipificaron utilizando microsatélites, cuatro cepas de *N. caninum* (Cabrera et al., 2019). Los resultados obtenidos en este estudio, se explican de manera detallada en la sección 1.7 de la presente tesis.

En el reporte de Macías-Rioseco et al., 2020, de 102 casos de abortos analizados provenientes de rodeos lecheros, con muestras de fetos, fetos con placenta y placenta; se encontró que el 29% de los abortos fueron causados por *N. caninum*. Se realizaron exámenes patológicos microscópicos, test serológicos y microbiológicos para varios agentes causantes de aborto. En el caso del diagnóstico de *N. caninum* se realizó por PCR e inmunohistoquímica para la detección de ADN y antígenos, respectivamente, además del examen patológico.

En otro estudio epidemiológico realizado por Macchi et al., 2020 en rebaños lecheros de Uruguay, se analizaron muestras de suero por ELISA indirecto, encontrándose que la seroprevalencia de *N. caninum* fue de 22,3% (CI_{95%}: 18,8 - 25,9%) y 96% (CI_{95%}: 92,1 - 99,8%) a nivel individual y de rebaño respectivamente. Se concluyó que la neosporosis es una enfermedad endémica en el país. Además, se analizaron factores de riesgo asociados a la enfermedad, como la presencia de perros en los establecimientos, o co-infección con agentes virales. Si bien no se pudo determinar el riesgo potencial de la enfermedad debido a la presencia o ausencia de perros, ya que en los rebaños analizados todos tenían por lo menos un perro, se reportó que cuanto mayor es el número de perros, mayor es el riesgo de tener elevados niveles de infección. El riesgo de tener seroprevalencias mayores aumenta 1,43 veces por cada perro presente en el establecimiento. Tampoco se encontró asociación con co-infecciones con agentes virales como IBR (rinotraqueitis infecciosa bovina) y LBE (leucosis bovina enzoótica).

1.3 Taxonomía

N. caninum es un parásito protozoario coccidio, intracelular obligado, del filo Apicomplexa. Este filo abarca más de 5000 especies de protozoos parásitos pero solo una pequeña fracción de los apicomplexas se conoce como patógenos para humanos y ganado. Por ejemplo, *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). Todos los apicomplexas presentan un complejo apical ubicado en un extremo de su estructura unicelular eucariota, un orgánulo evolutivamente único para estas especies, que da nombre al filo (Goodswen et al., 2013).

La clasificación taxonómica de *N. caninum* se muestra en la figura 2. Una segunda especie de *Neospora* se ha descrito en caballos, asociada a encefalomiелitis fetal.

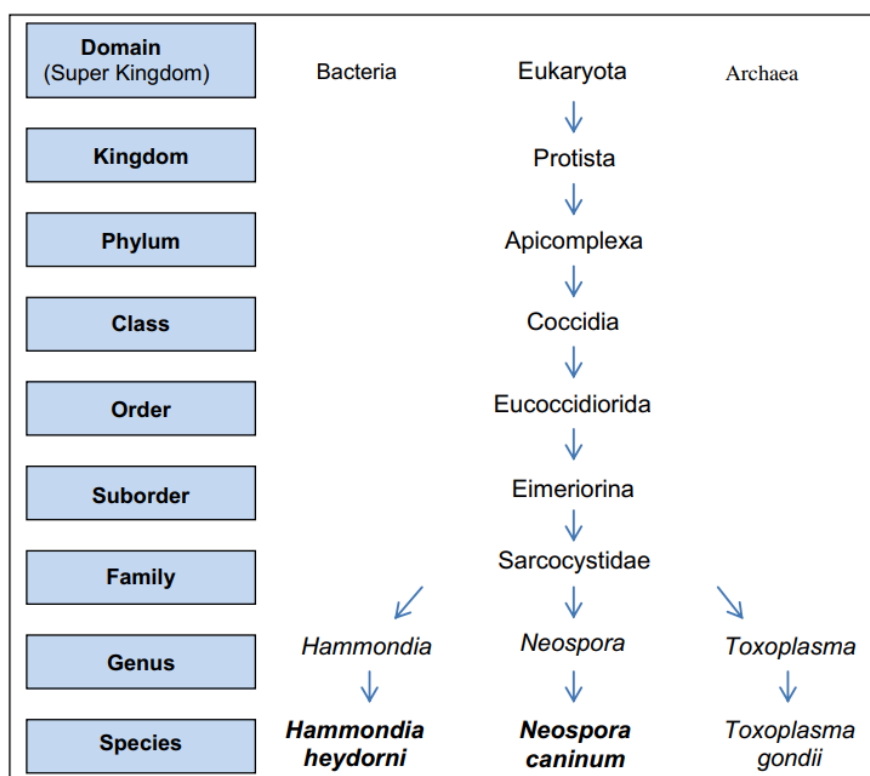


Figura 2. Clasificación taxonómica de *N. caninum*. Tomado de Goodswen et al., 2013.

1.4 Estadíos en el ciclo biológico

N. caninum se caracteriza por tres etapas infecciosas: taquizoítos (fig. 3A), bradizoítos (fig. 3B) que forman los quistes tisulares (fig. 3C) y esporozoítos (fig. 3E) presentes en los ooquistes (fig. 3D). Los taquizoítos y los quistes tisulares son los estadíos infectantes que se encuentran en los tejidos del hospedador intermediario,

mientras que los ooquistes son eliminados al medio ambiente con las heces del hospedador definitivo (Cabrera, A. 2020).

Los taquizoítos son la forma replicativa del parásito, diseminan la infección extracelularmente al desplazarse entre las células del huésped o a través de la sangre; y se transmiten transplacentariamente al feto. Son formas invasivas, muy infectivas y se caracterizan por su rápida replicación que causan daño tisular (Lindsay & Dubey, 2020). Tienen forma de semiluna y se alojan dentro de vacuolas parasitóforas (L. M. Campero et al., 2023). Este estadio es el causante de la fase aguda de la infección y el responsable de la clínica de la enfermedad en el hospedador intermediario (Dubey et al., 2002)

Los bradizoítos son el estadio que genera la infección crónica de la enfermedad en el hospedero intermediario. Se caracterizan por su multiplicación lenta, generar los quistes tisulares en el hospedero en el tejido del sistema nervioso central y principalmente en tejido muscular esquelético (Dubey & Lindsay, 1996b).

La conversión de la forma de replicación rápida (taquizoíto) a la forma quística de crecimiento lento (bradizoíto) es una respuesta del parásito al estrés ambiental. Este proceso es clave para la persistencia de la infección crónica en el huésped. El proceso implica alteraciones globales en la expresión génica del parásito. El parásito debe sentir los cambios en su entorno y responder activando o desactivando genes específicos para adaptarse a la nueva etapa de su ciclo de vida. Durante esta conversión, las proteínas de superficie del parásito sufren cambios significativos, lo que permite diferenciar las dos etapas. Por un lado, las principales proteínas de superficie de los taquizoítos, conocidas como NcSAG1 y NcSRS2, son reguladas disminuyendo su expresión durante el proceso de conversión a bradizoíto. Estas proteínas son inmunodominantes y son los principales objetivos de la respuesta inmune del huésped durante la fase aguda de la infección. Paralelamente, se activan y expresan nuevas proteínas de superficie que son específicas de los bradizoítos, como NcBAG1 y NcSAG4. Estas proteínas son cruciales para la formación de la pared del quiste tisular y para la supervivencia del parásito en el estado crónico. Este cambio permite al parásito evadir la respuesta inmune del huésped y establecer una infección crónica (Vonlaufen et al., 2004).

Los quistes tisulares son de forma redonda u oval, y contienen hasta 200 bradizoítos (Dubey, 2003a). La pared del quiste tisular tiene hasta 4 μm de grosor y se cree que los bradizoítos producen etapas asexuales y sexuales en los intestinos de los

cánidos, lo que resulta en la excreción de ooquistes en sus heces (Peters et al., 2001). Los quistes tisulares pueden persistir de por vida en los hospederos intermediarios sin causar manifestaciones clínicas significativas.

Los ooquistes de *N. caninum* se excretan sin esporular en las heces y la esporulación ocurre fuera del hospedador, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, a las 24 hs. Contienen dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos. Actualmente, se sabe poco sobre la frecuencia de eliminación de ooquistes de *N. caninum*, la supervivencia de los ooquistes en el medio ambiente y cuántos cánidos diferentes pueden servir como hospedadores definitivos (Lindsay & Dubey, 2020).

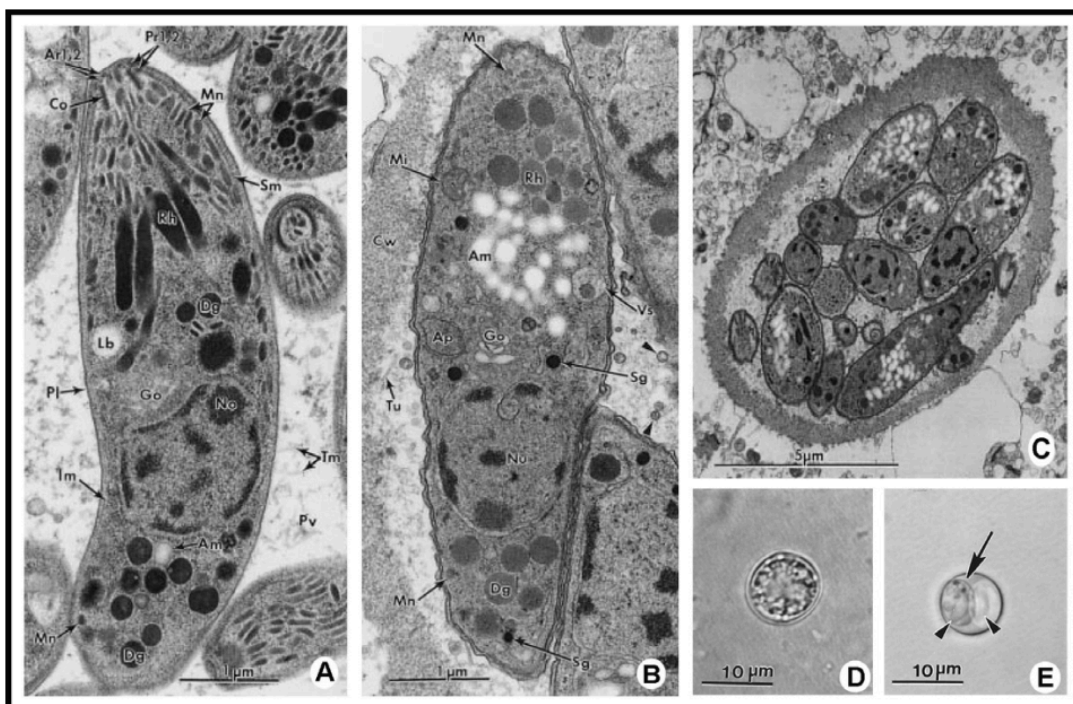


Figura 3. Microscopía electrónica que muestra la ultraestructura de: (A) taquizoítos, (B) bradizoítos, (C) quiste tisular, (D) ooquiste sin esporular y (E) ooquiste esporulado con esporozoítos. Tomado de Goodswen et al., 2013.

1.5 Ciclo biológico de *N. caninum*

Se define como un ciclo biológico heteroxeno facultativo porque tiene dos tipos de hospedadores: uno definitivo que son los cánidos y otro intermediario, que son herbívoros en su mayoría (McAllister et al., 1998).

Se han descrito como hospedadores definitivos el perro (Barber & Trees, 1998; Dubey, 1999, 2003a; Dubey & Lindsay, 1990b; McAllister et al., 1998; Ruehlmann et al., 1995), el coyote (Gondim, 2006; Gondim et al., 2004), el dingo (Almería, 2013; King

et al., 2010) y el lobo (Dubey et al., 2011, 2014). En América del Sur, el perro doméstico se ha descrito como un factor decisivo en el mantenimiento de la neosporosis (Dubey & Schares, 2011), juegan un papel fundamental en la epidemiología de la neosporosis bovina como los principales diseminadores de la enfermedad a través de la transmisión horizontal (Dubey et al., 2007).

El ganado bovino (Anderson et al., 1991; Thilsted & Dubey, 1989), ovino y caprino (Chávez-Velásquez et al., 2004; Dubey, 2003a; Gondim, 2006; Moore, 2005) se han descrito como hospedadores intermediarios. También se han reportado infecciones por *N. caninum* en otros animales domésticos y silvestres, como cerdos (Gui et al., 2020; Helmick et al., 2002; Karamati et al., 2025; Snak et al., 2019), ovejas (Dubey & Lindsay, 1990a), ciervos (Woods et al., 1994), caballos (Dubey & Porterfield, 1990; Gray et al., 1996; Marsh et al., 1996), roedores (Bentancourt Rossoli et al., 2023; Muradian et al., 2012; Nazari et al., 2020), aves (Mineo et al., 2009), entre otros. Se ha evidenciado en Argentina, la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en zorro colorado y zorro gris pampeano, ciervo axis, ciervo colorado, liebre europea, laucha doméstica, visón americano (Runco et al., 2024).

Hay evidencia, aunque poca, de que *N. caninum* puede infectar al ser humano (Duarte et al., 2020; Ibrahim et al., 2009; Oshiro et al., 2015). Si bien no se considera una zoonosis, estudios serológicos indican que *N. caninum* es capaz de infectar humanos, particularmente individuos inmunocomprometidos y mujeres embarazadas. Las similitudes biológicas entre *N. caninum* y *T. gondii* sugieren la posibilidad de transmisión de *N. caninum* a humanos (Rojas-Pirela et al., 2021).

Una vez que un bovino o canino se infecta, el mismo quedará muy probablemente infectado de por vida, sin sufrir sintomatología alguna, pero sí podrá transmitir la infección a sus crías.

Hay dos modos distintos de reproducción del parásito en el ciclo: la reproducción sexual, que se da en los cánidos (el hospedador definitivo); y la reproducción asexual que ocurre en los hospedadores intermediarios, como el ganado bovino (Piaggio, J., et al, 2007).

A su vez, hay dos vías de transmisión del parásito: una horizontal, que ocurre cuando un animal se infecta ya sea por la ingesta de taquizoítos y/o quistes tisulares o bien por consumir agua y/o alimentos contaminados con ooquistes esporulados; y otra vertical o transplacentaria. El parásito puede transmitirse transplacentariamente en varios hospedadores, y la ruta vertical es el modo principal de su transmisión en el

ganado lechero doméstico. No existe transmisión de *N. caninum* de vaca adulta a vaca adulta. Aunque *N. caninum* se ha encontrado en semen bovino, es poco probable que se transmita por semen o por transferencia de embriones de las vacas donantes (Lindsay & Dubey, 2020).

En las diferentes especies, una vez ingresado el agente a un rodeo o a una determinada población, la principal vía de propagación y mantenimiento de la infección es la transplacentaria.

El ciclo comienza con los ooquistes no esporulados que se excretan en las heces de los cánidos infectados. La robusta pared del ooquiste, resistente a la congelación y la desecación, permite que los esporozoítos sobrevivan potencialmente en un ambiente externo al hospedador durante largos periodos (Alves Neto et al., 2011). Fuera del hospedador, los ooquistes esporulan conteniendo dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos. Animales como el ganado bovino pueden ingerir ooquistes esporulados presentes en pastos contaminados con heces o en agua e infectarse. Los esporozoítos se liberan de los ooquistes en el intestino del hospedador, tras lo cual invaden la pared intestinal y se transforman en taquizoítos. Estos taquizoítos, que residen en vacuolas parasitóforas, pueden invadir e infectar diferentes tipos de células en el hospedero, como macrófagos, células del sistema nervioso, musculares, hepáticas, entre otras. Proliferan hasta que las células del huésped se destruyen y entonces nuevamente infectan otras células (Lindsay & Dubey, 2020). Posteriormente, alcanzan el torrente circulatorio produciéndose la diseminación intraorgánica del parásito. Los taquizoítos pueden invadir una amplia variedad de órganos y tejidos, tales como el corazón, pulmón, hígado, músculo esquelético, placenta, cerebro o piel (Dubey, 2003b; Dubey & Lindsay, 1996a). A lo largo del tiempo, el hospedador desarrolla una respuesta inmune capaz de eliminar a la mayoría de los taquizoítos, aunque algunos logran evadirla y se diferencian al estado latente de bradizoítos. Iniciando la fase crónica de la infección en tejidos del sistema nervioso central y muscular esquelético, formando quistes tisulares latentes de paredes gruesas (Lindsay & Dubey, 2020). Los quistes tisulares se han detectado en el sistema nervioso central y músculo esquelético (Dubey & Lindsay, 1996b). El ciclo se completa cuando los quistes de bradizoítos, por ejemplo en carne contaminada, son ingeridos por cánidos. Pueden sobrevivir el pasaje por el estómago pero, liberan bradizoítos que infectan las células epiteliales del intestino delgado. Los ooquistes conteniendo

esporozoítos se formarán nuevamente y el ciclo se repite, a través de la transmisión horizontal (Goodswen et al., 2013).

En el caso del hospedador intermediario, ocurre transmisión vertical por vía transplacentaria, de madre al feto. Es altamente eficiente, hasta 95%, y el principal modo de transmisión de *N. caninum* en el ganado (Dubey et al., 2007). Una alta proporción de vacas infectadas transmiten la infección a sus crías, lo que mantiene el nivel de infección en el rebaño. Las hembras se mantienen infectadas por el resto de su vida, transmitiendo la infección verticalmente a través de las sucesivas generaciones. Aunque el mecanismo preciso de transmisión transplacentaria y pérdida fetal es poco conocido, se sabe que los taquizoítos se transmiten de una madre infectada al feto a través de la placenta y pueden causar una infección fetal que puede provocar un aborto (Goodswen et al., 2013). Se sabe que la transmisión transplacentaria del parásito se puede dar de dos maneras: por transmisión exógena (ocurre en vacas que adquieren la infección por primera vez por el consumo de ooquistes esporulados durante la gestación, transmitiendo la infección a su descendencia como consecuencia de una infección aguda) o endógena (ocurre por la recrudescencia de una infección crónica durante la gestación) (Dubey et al., 2007). En la figura 4 se muestra el ciclo biológico del parásito.

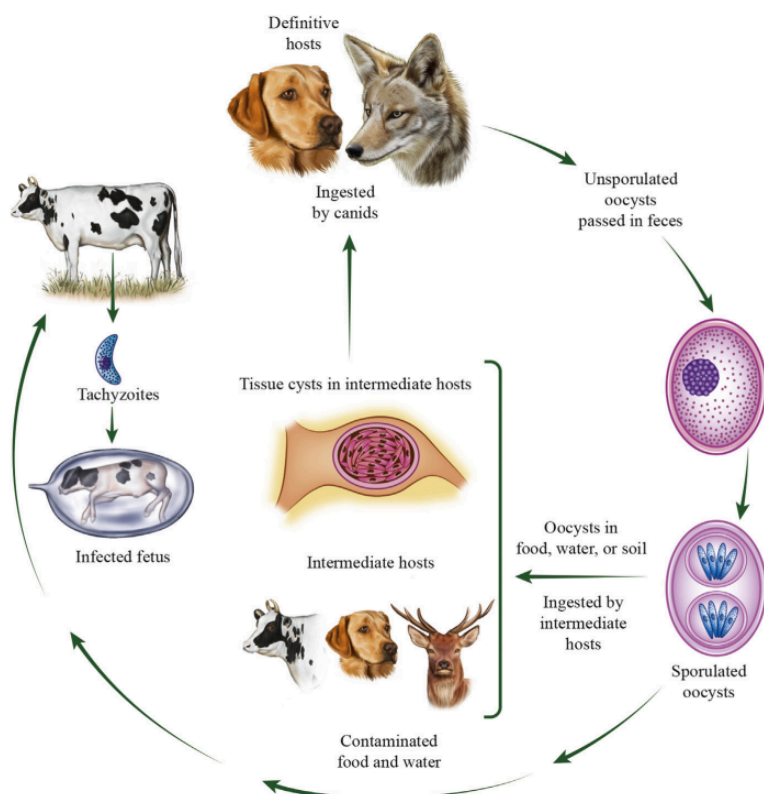


Figura 4. Ciclo de vida de *N. caninum*. Tomado de Lindsay & Dubey, 2020.

Entonces, el ganado puede infectarse con *N. caninum* de varias maneras, incluyendo: (i) ingestión de ooquistes esporulados en el ambiente (transmisión horizontal), (ii) ingestión de ooquistes esporulados por hembras preñadas, resultando en la transmisión de taquizoítos al feto por vía transplacentaria, (iii) reactivación de infección latente en una hembra preñada con proliferación de taquizoítos que cruzan la barrera placentaria y son transmitidos al feto (Ribeiro et al., 2019).

Se ha establecido la existencia de un ciclo silvestre además del ciclo doméstico descrito anteriormente. El parásito es capaz de circular entre ambos, siendo posible entonces, la transmisión del parásito de animales silvestres al perro, y posteriormente de éste al ganado bovino, así como del ganado bovino a cánidos silvestres, y de éstos a los rumiantes silvestres (Gondim, 2006; Gondim et al., 2004).

1.6 Signos clínicos y epidemiología

Una vez ingresados al huésped, los taquizoítos de *N. caninum* producen focos de necrosis en diversos tejidos, destruyendo células al multiplicarse activamente en neuronas, macrófagos, fibroblastos, endotelios, hepatocitos. Las lesiones características son focos de necrosis en diversos órganos como cerebro, médula, corazón, músculo esquelético e hígado (Piaggio, J., et al, 2007).

N. caninum es responsable de inducir abortos tanto en ganado lechero como en ganado de carne. Las vacas de cualquier edad pueden abortar desde los 3 meses de gestación hasta casi el término. La mayoría de los abortos inducidos por neosporosis ocurren entre los 5 y 6 meses de gestación. Los fetos pueden morir intrauterinamente, ser reabsorbidos, momificados, autolizados, nacer muertos, nacer vivos con signos clínicos o nacer clínicamente normales pero con infección crónica. Los abortos inducidos por neosporosis ocurren durante todo el año. Los terneros infectados con *N. caninum* pueden presentar signos neurológicos, bajo peso, incapacidad para levantarse o nacer sin signos clínicos de la enfermedad. Las extremidades traseras, delanteras o ambas pueden estar flexionadas o hiperextendidas. Ocasionalmente causa defectos congénitos, incluyendo hidrocefalia y estrechamiento de la médula espinal (Lindsay & Dubey, 2020).

Los abortos en un rodeo pueden ocurrir con patrones esporádicos, endémicos o epidémicos. Se considera un patrón de abortos endémicos cuando la tasa de abortos

es mayor al 5% anual y que persiste por años. Los abortos son considerados epidémicos cuando al menos un 10% de las vacas en riesgo aborta dentro de 6 a 8 semanas. El aborto epidémico o tormenta de abortos, probablemente se origine por una fuente de exposición (por transmisión horizontal) a partir de agua o alimentos contaminados, mientras que los abortos endémicos o esporádicos persisten en un rebaño como el resultado de una propagación vertical (Piaggio, J., et al, 2007).

Se han reportado infecciones por *N. caninum* en la mayor parte del mundo. La prevalencia de neosporosis varía considerablemente entre países, dentro de cada país, entre regiones y entre ganado de carne y ganado lechero. Las diferencias de prevalencia se relacionan predominantemente con los diversos factores de riesgo y de protección contra la infección o la enfermedad. Existen factores que afectan el riesgo de infección y otros que influyen en el riesgo de aborto. La prevalencia del aborto asociado a *N. caninum* también varía en todo el mundo y puede mostrar un patrón esporádico, endémico o epidémico (Piaggio, J., et al, 2007). En la región, se ha reportado neosporosis en Brasil (Gondim et al., 1999), Argentina (C. M. Campero et al., 1998), Perú (Puray Ch. et al., 2006), Paraguay (Osawa et al., 2002), Chile (Patitucci et al., 2000), Venezuela (Lista-Alves et al., 2006) y Uruguay (Cobo et al., 1999). En Uruguay la neosporosis es una enfermedad endémica, que se propaga en los rodeos de ganado lechero y de carne (Macchi et al., 2020). Estudios seroepidemiológicos realizados en Uruguay han reportado prevalencias de infección por *N. caninum* que oscilan entre 86,5% y 96% a nivel de establecimiento en sistemas de producción de carne y leche, respectivamente. A nivel individual, las prevalencias fueron de 22,3% en ganado lechero y 14,3% en ganado de carne (Da Silva Silveira et al., 2020). Dada la alta infección a nivel de rebaño y la similitud con la seroprevalencia reportada en 2003, puede considerarse que la vía vertical de infección es de gran importancia; por lo tanto, se considera muy eficiente en el ganado, ya que es responsable de perpetuar la infección en el rebaño. La infección no podría mantenerse en el rebaño sólo con transmisión vertical, ya que su eficiencia no es del 100 %. Por esta razón, la transmisión horizontal también juega un papel clave en la persistencia de la enfermedad en los rebaños; sin ella, los niveles de infección tenderían a disminuir con el tiempo (Macchi et al., 2020).

Un meta análisis realizado en 2019 sobre la prevalencia y factores de riesgo asociados a la neosporosis bovina (Ribeiro et al., 2019), sostiene que la prevalencia agrupada a nivel mundial de *N. caninum* es de 20 % (CI_{95%}, 18 - 21). En cuanto a

subgrupos, la mayor prevalencia se encontró en el continente americano, con 24% (CI_{95%}, 19 - 29) para Norte y Centroamérica, y 24% (CI_{95%}, 20 - 28) para América del Sur. En Asia, fue de un 18%, 15% en Europa, 13% en África y 8% en Oceanía. Los costos por la neosporosis bovina son mayores en las Américas que en otras regiones del mundo, causando en América del Sur pérdidas por US \$239.7 millones.

Este meta análisis también indica que las vacas infectadas son 1,6 veces más propensas a abortar que las seronegativas; y que la infección por *N. caninum* es más frecuente en el ganado lechero que en ganado de carne. No encontraron una asociación significativa entre la prevalencia de *N. caninum* y la edad del ganado, pero en las granjas o establecimientos en donde había perros, el ganado es 1.84 veces más susceptible a la infección por *N. caninum*, en comparación con aquellos establecimientos en donde no se reporta la presencia de perros. La presencia de perros en las granjas y el tipo de sistema de producción del ganado (si es ganado lechero o cárnico) son factores que aumentan el riesgo de infección por *N. caninum*. Estos hallazgos justifican la implementación de estrategias de mitigación para reducir la prevalencia de neosporosis bovina y las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad (Ribeiro et al., 2019).

1.7 Variabilidad genética y fenotípica

Estudios previos, mostraron que existe diversidad genética entre los aislados de *N. caninum* de regiones geográficamente adyacentes, incluyendo las presentes en Sudamérica. Sin embargo, la diversidad genética de *N. caninum* en Sudamérica ha sido poco estudiada en comparación con la diversidad mundial. Se ha reportado un aislamiento autóctono de Argentina y dos nuevos aislamientos brasileños. En Uruguay se caracterizaron cuatro cepas de *N. caninum*, denominadas *NcUru1* y *NcUru2* (muestras provenientes de Colonia), *NcUru3* (proveniente de Soriano) y *NcUru4* (de Durazno). La variabilidad fenotípica entre las diferentes cepas está asociada a diferencias genéticas identificadas mediante microsatélites y polimorfismos nucleares. Los microsatélites son marcadores moleculares altamente variables, que permiten el genotipado de individuos dentro de una población y el estudio de las relaciones filogenéticas. Se usó una combinación de nueve microsatélites: MS4, MS5, MS6A, MS6B, MS7, MS8, MS10, MS12 y MS21. El único alelo de microsatélites compartido entre los cuatro aislados fue MS8, compuesto por 13 repeticiones. Este alelo también

se encuentra en aislados brasileños y se ha detectado en muestras obtenidas de abortos causados por *N. caninum* en Argentina. *NcUru2* solo compartía MS8 con *NcUru1*, *NcUru3* y *NcUru4*, y era distinto de todos los demás microsatélites. Además, *NcUru2* compartía poca identidad a nivel de microsatélites con aislados previamente reportados de la región, mostrando una combinación de MS7 y MS10 que no se había descrito previamente en cepas de Argentina y Brasil. La combinación individual de microsatélites era única y no se había reportado previamente. Estas cuatro cepas representan tres linajes genéticos distintos según la tipificación de microsatélites, lo que difiere significativamente de otros aislados ampliamente caracterizados, como la cepa de referencia *N. caninum* Liverpool (*NcLiv*). El estudio de la secuencia genómica de las cepas uruguayas, mostró que *NcUru1*, *NcUru3* y *NcUru4* están genéticamente agrupadas, mientras que *NcUru2* se agrupa de manera más distante, sugiriendo que es la cepa más diferenciada genéticamente (fig. 5). Al sumar las cepas regionales y mundiales, las diferentes cepas de *N. caninum* se pueden agrupar en seis grandes grupos (Cabrera et al., 2019).

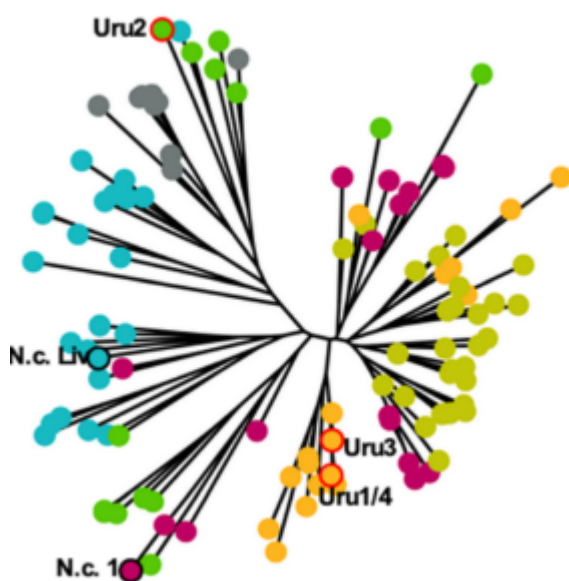


Figura 5. Árbol filogenético creado utilizando el método de unión de vecinos o neighbor-joining. Tomado de Cabrera et al., 2019.

En experimentos con ratones infectados con parásitos purificados de estas cepas, se observó que no mostraban signos clínicos de infección y tenían la misma tasa de supervivencia que los ratones del control negativo. Al analizar la capacidad de persistencia crónica en el hospedador, se observó que varía significativamente con respecto a *NcLiv* y entre las cepas uruguayas, que mostraron una habilidad

significativamente menor para persistir de forma crónica en comparación con la cepa de referencia (fig. 6A) Tampoco se observaron diferencias significativas en las tasas de preñez entre las cepas uruguayas y *NcLiv*; pero la tasa de transmisión vertical fue considerablemente menor en las cepas *NcUru1-4* vs *NcLiv* (fig. 6B) (Cabrera et al., 2023).

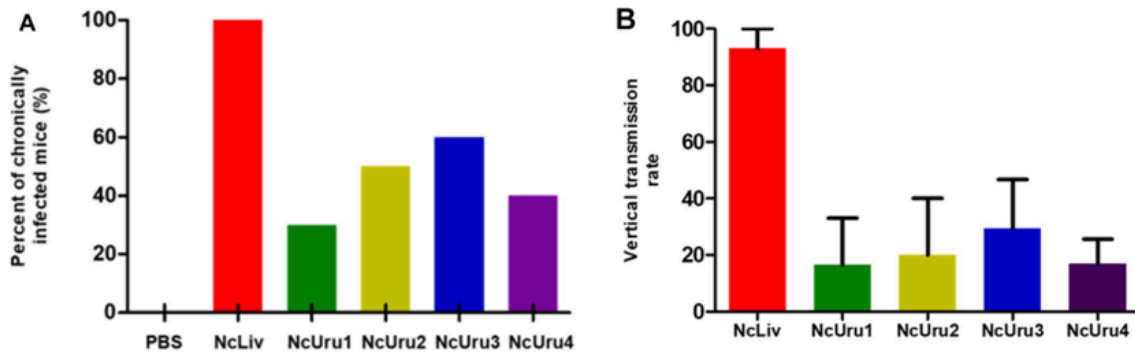


Figura 6. A) Porcentaje de ratones infectados crónicamente con la cepa de referencia y las cuatro cepas uruguayas. **B)** Tasa de transmisión vertical, expresada como porcentaje de progenie infectada determinado por detección por PCR de ADN del parásito en cerebros de fetos viables. Tomado de (Cabrera et al., 2023).

Las cepas uruguayas fueron menos invasivas, *NcUru1* es la mitad de invasivo que *NcLiv*, mientras que *NcUru2* invade aproximadamente un 25% menos de células que *NcLiv* en el mismo periodo. *NcUru3* invade las células huésped con una eficiencia similar a la de referencia. Cabe destacar que *NcUru4* presenta una tasa de invasión significativamente reducida (18%) (fig. 7A). Al evaluar el crecimiento intracelular relativo de cada cepa, se observó que *NcUru4* exhibe una tasa de crecimiento similar a la de *NcLiv*, lo que sugiere que los parásitos que logran invadir tienen la misma capacidad de crecer intracelularmente. *NcUru1* (72%), *NcUru2* (53%) y *NcUru3* (38 %) presentaron un crecimiento comparativamente más lento que *NcLiv* (fig. 7B). La menor eficiencia de *NcUru1* en la invasión y el crecimiento intracelular concuerda con su menor eficiencia para generar infección crónica y menores tasas de transmisión vertical (Cabrera et al., 2023).

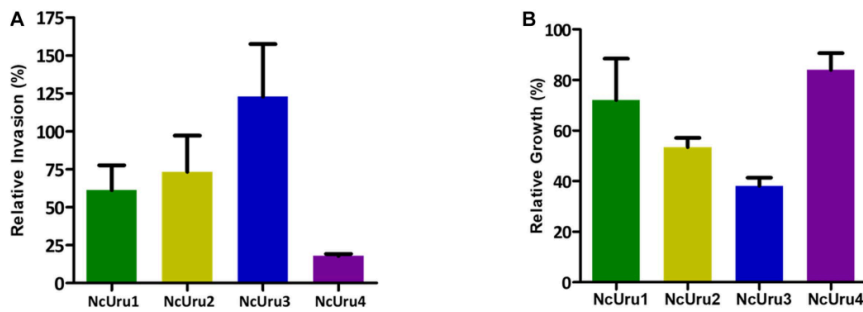


Figura 7. A) Tasa de invasión relativa de cada cepa uruguaya con respecto a *NcLiv*. **B)** Crecimiento intracelular de las cepas *NcUru1-4* con respecto a *NcLiv*. Tomado de Cabrera et al, 2023.

1.8 Inmunidad y antígenos

N. caninum es un protozoo de vida intracelular. Por eso, la respuesta inmune celular es la que está relacionada con la protección de la enfermedad, si bien cuando el hospedador se infecta produce también anticuerpos específicos. Las células dendríticas y macrófagos representan la primera línea de defensa que permite al hospedador activar mecanismos para contener la infección mientras la inmunidad adaptativa comienza a activarse. Las citoquinas resultantes de la activación de la respuesta innata orientan y modulan la respuesta adaptativa, que será responsable de contener la infección. En este sentido, la inmunidad protectora frente a la infección por *N. caninum* es iniciada por el eje interleuquina (IL)12 /interferón γ (IFN γ). Cuando los macrófagos y células dendríticas contactan con el patógeno, producen IL 12, la cual polariza la diferenciación de los linfocitos TCD4 a un perfil Th1, productor de IFN γ . Esta citoquina es fundamental en la protección, particularmente en la etapa aguda de la infección por *N. caninum*, limitando la proliferación parasitaria en distintos tejidos y células (Innes et al., 1995). Adicionalmente, las células NK y linfocitos TCD8 juegan un rol clave en el control, ya que, además de ser potentes productoras de IFN γ , eliminan células infectadas causando su muerte por apoptosis (Boysen et al., 2006).

Tanto una primoinfección como una reactivación de una infección crónica por *N. caninum* en el momento de la preñez, constituyen una situación compleja a nivel inmunológico, ya que la hembra preñada debe, por un lado, intentar contener la infección a través de las citoquinas y mecanismos mencionados anteriormente, y, por otro lado, garantizar el buen término de la gestación. Por un lado, es necesaria una respuesta Th1 dominante para combatir la infección, resultando en la producción de citoquinas inflamatorias y perjudiciales para el feto. Por otra parte, la progesterona y

otros mecanismos inmunomoduladores, inducen la producción de citoquinas de la respuesta Th2 que no se relacionan directamente con la protección, pero sí lo hacen con la posibilidad de continuar la preñez. A su vez, el momento de la gestación en que el parásito se encuentre activo, determinará, especialmente en los bovinos, la manifestación clínica de la enfermedad (L. M. Campero et al., 2023).

La capacidad del feto de desarrollar una respuesta inmune aumenta a medida que progresa la gestación. En bovinos, a partir del segundo tercio de la preñez, el feto es capaz de desarrollar tanto una respuesta inmune celular como humoral (mediada por anticuerpos). Por lo tanto, la inmunocompetencia del feto al momento de la infección por *N. caninum* determinará la severidad de la enfermedad y la carga parasitaria en los tejidos fetales, siendo ambas progresivamente menores a medida que la infección ocurre más tardíamente en la gestación. En bovinos, cuando la infección ocurre en el primer o segundo tercio de la preñez, se detecta *N. caninum* en varios tejidos fetales (cerebro, corazón, riñón y pulmón), mientras que sólo se detectan parásitos en el cerebro cuando la infección ocurre en el tercer trimestre de preñez, evidenciando la importancia de la edad fetal en la severidad de la enfermedad. Por lo tanto, una infección fetal hacia el final de la preñez, probablemente resulte en el nacimiento de terneros sanos, pero congénitamente infectados, que, de ser conservados para reposición en el rodeo, pueden mantener la infección de forma endémica (L. M. Campero et al., 2023).

Altos niveles de anticuerpos son detectables en los animales luego de la infección, los cuales perduran durante meses; sin embargo, su rol en la protección de la infección por *N. caninum* no es claro. Es posible que los anticuerpos actúen inhibiendo la invasión de las células blanco, en los momentos de la infección donde los taquizoítos se encuentran extracelularmente (Innes et al., 2002), opsonizando al parásito para que macrófagos lo fagociten. Sin embargo, los anticuerpos producidos contra el parásito son una buena herramienta para el diagnóstico de la enfermedad (McAllister, 2016a).

Si bien los mecanismos producidos por el parásito para causar la muerte fetal no están del todo claros, podría deberse a la invasión y multiplicación de *N. caninum* en los tejidos placentarios y fetales, provocando graves lesiones y afectando la supervivencia fetal. El otro mecanismo asociado al aborto pueden ser las lesiones en la placenta que podrían provocar un intercambio gaseoso y de nutrientes insuficiente (Dubey et al., 2006).

En *N. caninum* se han descrito y caracterizado dos antígenos inmunodominantes en los taquizoítos, denominados NcSAG1 (llamada anteriormente Ncp36 en Hemphill, Fuchs, et al., 1997; Howe et al., 1998; Sonda et al., 1998) y NcSRS2 (llamada previamente Ncp35 o Ncp43 en Hemphill, Felleisen, et al., 1997; Howe et al., 1998). Ambas proteínas de superficie son importantes antígenos inmunodominantes que juegan un rol en el reconocimiento de la célula hospedera, adhesión e invasión. NcSRS2 se expresa en taquizoítos y en bradizoítos, y tiene un 44 % de homología con TgSRS2 de *T. gondii*, mientras que NcSAG1 es uno de los mayores antígenos de superficie de los taquizoítos, con un 53 % de homología con TgSAG1 de *T. gondii* (Alves Sinnott et al., 2020a).

Debido a su fuerte reactividad inmunológica, estas proteínas se han utilizado extensamente como antígenos candidatos para el desarrollo de ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) (Alves Sinnott et al., 2020b; Wilkowsky et al., 2011). En el Laboratorio Interacciones Patógeno Hospedero del Institut Pasteur de Montevideo, donde se realizó el presente trabajo, se produjeron, purificaron y caracterizaron ambas proteínas recombinantes (rNcSAG1 y rNcSRS2) en un sistema de expresión S2 de *Drosophila melanogaster* (Echeverría et al., 2025).

1.9 Diagnóstico

Existen varias técnicas de diagnóstico para detectar la infección por *N. caninum*. Los métodos directos utilizados son: la histopatología e inmunohistoquímica, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la observación de formas infectivas y el aislamiento. Los métodos indirectos se fundamentan en la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* presentes principalmente en suero, pero también podrían buscarse en líquido amniótico, leche, entre otros. Las técnicas más utilizadas son la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoensayos (ELISAs) indirectos y aglutinación, utilizando en algunos casos el inmunoblot como prueba confirmatoria. Es importante considerar que al adquirir kits comerciales o en el diseño de ELISAs de desarrollo propio, se deben estandarizar los títulos de corte según la zona geográfica donde serán utilizados (OIE, 2019). Así se refleja en los hallazgos de L. M. Campero et al., 2018 que detectaron una gran variación entre pruebas diagnósticas utilizadas de rutina para neosporosis bovina en

Iberoamérica (IFI, ELISA comercial y ELISA *in house*). El inmunoblot es una prueba serológica que evalúa la inmunorreacción entre un antígeno separado según su peso relativo en una electroforesis (SDS-PAGE) e inmunotransferido a una membrana de nitrocelulosa y el suero problema. La lectura de resultados implica la detección visual de inmunorreacciones hacia los siguientes antígenos inmunodominantes en condiciones no reducidas: 19, 29, 30, 33 y 37 kDa. Se considera que una muestra es positiva cuando se registra reacción hacia ≥ 2 antígenos inmunodominantes (L. M. Campero et al., 2015; Schares et al., 1999).

El diagnóstico etiológico del aborto bovino es complejo y requiere del examen de laboratorio de fetos y placentas de vacas/vaquillonas abortadas, incluyendo el examen patológico macroscópico e histológico y una amplia variedad de pruebas microbiológicas para la detección de los agentes infecciosos abortígenos (Da Silva Silveira et al., 2020). En el DILAVE, el diagnóstico de rutina de *N. caninum* se realiza fundamentalmente por estudios histopatológicos de los fetos abortados, complementando esta información con resultados de serología y/o inmunohistoquímica. Primero se realiza la necropsia y la histopatología de los fetos, incluyendo el análisis histológico exhaustivo del sistema nervioso central con la coloración de hematoxilina-eosina. De encontrarse la lesión histológica característica, se realiza la identificación de las formas parasitarias por inmunohistoquímica y/o serología positiva de la madre y/o feto. Esta combinación seriada de técnicas diagnósticas, en la que sí y solo sí, se realiza el diagnóstico final si todas las pruebas son positivas, asegura una muy alta especificidad diagnóstica y se considera como la prueba de referencia para el diagnóstico de la enfermedad en fetos (Briano et al., 2021). En los laboratorios de diagnóstico veterinario en América del Sur, la posibilidad de realizar alguna de estas pruebas es limitada.

A pesar de su importancia, el diagnóstico etiológico de aborto en bovinos representa un desafío técnico, en parte debido a la dificultad de recuperar los fetos abortados en condiciones extensivas de campo, como las producciones ganaderas en la mayoría de los países sudamericanos, y además de la recuperación de los fetos y placentas antes de que sean depredados o descompuestos. Estas dificultades limitan la posibilidad de detectar tempranamente los vientres abortados y de efectuar la investigación patológica y microbiológica de los abortos. Sin embargo, la identificación de animales que perdieron la gestación suele ser simple a través de exámenes visual y/o clínico de campo realizado por veterinarios o productores agropecuarios. Esto

permite la obtención de muestras de sangre o leche de estos animales para el análisis de laboratorio. Por tal motivo, para el diagnóstico indirecto de infección por *N. caninum*, un enfoque serológico poblacional basado en la detección de anticuerpos en el suero, plasma o leche de vacas/vaquillonas abortadas vs no abortadas usando ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), puede ser de utilidad para la aproximación diagnóstica de los abortos causados por este agente.

Las pruebas de ELISA demuestran un alto rendimiento en términos de sensibilidad y especificidad, y se encuentran disponibles comercialmente a través de una variedad de proveedores que importan kits producidos principalmente en Europa y Estados Unidos. Sin embargo, estas pruebas no siempre han sido adecuadamente validadas en nuestra región, además de tener un costo considerable (Da Silva Silveira et al., 2020).

Estudios previos en el laboratorio donde se desarrolló esta tesis, permitieron la creación de un test ELISA *in house*, para el diagnóstico serológico de la neosporosis bovina, buscando disminuir costos. Se trata de un ELISA indirecto cuantitativo, para la detección de anticuerpos IgG contra *N. caninum* en muestras de sueros bovinos. El ensayo se basa en la unión de los anticuerpos al antígeno del parásito adsorbido en el pocillo de la placa. La reacción se revela con un anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa que cataliza la formación del complejo coloreado. La intensidad del color producido es proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en el suero.

Luego del escalado y producción del aislado *NcUru1*, se optimizó un protocolo para la obtención de proteínas totales a partir de taquizoítos del parásito. Se sensibilizaron placas con los antígenos generados, se analizaron sueros provenientes de tambos con historia reciente de abortos que previamente habían sido caracterizados por medio de tres kits diagnóstico comerciales. Estos kits, que detectan anticuerpos isotipo IgG específicos contra *N. caninum*, fueron los utilizados: 1) LSIVet, Bovine Neosporosis Advanced Serum ELISA Kit, Thermo Fisher Scientific, Lelystad, Países Bajos; 2) Hipra, CIVTEST® BOVIS NEOSPORA, Girona, España, y 3) Bio-X Diagnostics, NEOSPORA CANINUM ELISA KIT, Rochefort, Bélgica. Para la elaboración de los kits 1 y 2 se utilizan lisados de taquizoítos de *N. caninum* como antígeno, mientras que para el kit 3 se utiliza una proteína recombinante de *N. caninum* (NcSRS2) (Da Silva Silveira et al., 2020). Cabe destacar que los kits son de procedencia europea, realizados con cepas

que circulan en dicho continente, por lo que no son la mejor herramienta de diagnóstico para nuestro país y/o región. Es necesario considerar también factores como el tiempo y costos de importación, además del propio costo del kit, que suelen ser elevados.

Se determinó el punto de corte o *cut-off* para el ELISA *in house* desarrollado y se analizaron muestras mediante western blot para validar el ELISA desarrollado. Posteriormente, se logró expresar proteínas recombinantes (rNcSAG1 y rNcSRS) que se utilizan como antígenos para el ELISA *in house*, mejorando la reproducibilidad y robustez del ensayo. Sinnot y colaboradores, (Alves Sinnott et al., 2020a), reportaron que la sensibilidad y especificidad de un test ELISA utilizando ambas proteínas fue de 98,1% y 99,1%, respectivamente, para muestras de ganado bovino.

Una alternativa a los ensayos de inmunohistoquímica es la incorporación de técnicas moleculares, como PCR, la cual es altamente específica, sensible y rápida. Puede ser aplicada a una amplia variedad de muestras, como ser tejidos de fetos infectados, líquido amniótico, líquido cefalorraquídeo, heces, sangre, leche y semen (Briano et al., 2021).

1.10 Control y prevención

No existen vacunas efectivas para prevenir el aborto en el ganado. La única vacuna comercial (Neo Guard) para *N. caninum* ha sido removida del mercado debido a la falta de datos convincentes sobre su eficacia para prevenir abortos asociados a *N. caninum* en el ganado (Lindsay & Dubey, 2020).

Con respecto a los fármacos, no existen compuestos efectivos y seguros disponibles en el mercado. Por lo cual, la única manera de control hasta el presente es en base al manejo y a las medidas que serán definidas según el estudio del caso. 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 medio ambiente. Hay factores a tener en cuenta para la prevención de la neosporosis. Varios trabajos marcan una asociación directa entre presencia de perros en un establecimiento con alta prevalencia de neosporosis u ocurrencia de aborto en el establecimiento. El perro es el huésped definitivo, muy posiblemente el zorro también. El perro se contamina al ingerir animales infectados, ya sea roedores, fetos abortados, etc. Los bovinos y demás huéspedes intermediarios se infectan al ingerir pasturas, agua u otros alimentos contaminados con heces de perros

infectados. Una vez infectado el huésped intermediario, generalmente llevará la infección de por vida (Piaggio, J., et al, 2007). Teniendo en cuenta estos factores, las pautas de prevención de la transmisión vertical de la infección deben enfocarse en realizar el reemplazo con hembras serológicamente negativas de manera de impedir el nacimiento de terneros congénitamente infectados, cortando así la principal vía de difusión y permanencia de la enfermedad dentro del rodeo como es la vía transplacentaria. Para prevenir la transmisión horizontal de perros a bovinos, se recomienda la eliminación de tejidos potencialmente infectados, como fetos abortados, placentas o terneros muertos, de manera de impedir que los perros u otros cánidos las ingieran. También se recomienda impedir que los perros contaminen pasturas, raciones o aguadas con sus heces. Eliminar los perros del establecimiento puede disminuir el riesgo pero no es una solución definitiva al problema. Y aunque el establecimiento no tenga perros, hay que tener en cuenta la presencia de perros vagabundos y otros cánidos como fuente de contaminación del ambiente con ooquistes de *N. caninum* (Piaggio, J., et al, 2007).

Entonces, como medidas de bioseguridad que se deben realizar para reducir el nivel de contaminación ambiental con ooquistes de *N. caninum* son: limitar el acceso de perros a áreas donde se encuentran los rumiantes y áreas de almacenamiento de alimentos y agua; quitar rápidamente placentas o restos fetales en el caso de aborto; desechar correctamente el ganado muerto; establecer control de roedores (Sánchez-Sánchez et al., 2018). Además se recomienda el diagnóstico serológico de las madres para establecer la presencia de una infección por *N. caninum* (Reichel et al., 2014). A pesar del correcto diseño y la práctica meticulosa de estas medidas de control, no son rentables ni completamente efectivas para eliminar la neosporosis de un rodeo, y es necesario complementarlas con un enfoque terapéutico (McAllister, 2016b).

2. Objetivos

A partir del aislamiento de cepas circulantes de *N. caninum* en Uruguay y del estudio de su variabilidad con respecto a la cepa de referencia, se ha impulsado el desarrollo de métodos diagnósticos más accesibles. Con el objetivo de reducir costos, de incluir las cepas circulantes de nuestro país y la región para mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica, y hacer el diagnóstico practicable en todo el país, se produjo un kit ELISA *in house* y se optimizó un protocolo de PCR. En este contexto, la validación de estos métodos serológicos y moleculares se vuelve crucial. Dicha validación es un paso indispensable para consolidar una estrategia diagnóstica a nivel nacional, lo que permitiría la aplicación de medidas de prevención para controlar la enfermedad, un buen manejo y control del rodeo para disminuir o eliminar el patógeno, logrando así disminuir significativamente las pérdidas económicas asociadas.

2.1 Objetivo general

Evaluar métodos serológicos y moleculares para el diagnóstico de *N. caninum* en muestras de suero y citobrush de ganado bovino de carne.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Objetivo específico 1

Analizar sueros de bovinos de carne que presentan una clínica con la enfermedad (aborto) mediante un ELISA *in house*.

2.2.2 Objetivo específico 2

Caracterizar y confirmar por Western blot los sueros positivos a la prueba de ELISA desarrollada en el laboratorio.

2.2.3 Objetivo específico 3

Detectar por PCR la presencia de material genético de *N. caninum* en muestras de citobrush de bovinos de carne, que previamente tuvieron problemas en la gestación (aborto).

2.2.4 Objetivo específico 4

Evaluar y comparar las técnicas diagnósticas PCR y ELISA *in house* entre sí.

3. Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio Interacciones Hospedero-Patógeno, de la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo (IPM). En colaboración con el Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) La Estanzuela, ubicado en Colonia, Uruguay; y la Unidad Mixta Pasteur+INIA (UMPI) del IPM, en el marco del proyecto FPTA 396, “Estudio de causas infecciosas y factores genéticos asociados a pérdidas de gestación en ganado de carne de Uruguay”.

3.1 Muestras

Se trabajó con un banco de 153 muestras de suero bovino almacenadas a -20°C en UMPI del IPM, provenientes de establecimientos de distintas zonas del país (fig. 8), a partir de muestras de sangre extraídas por personal capacitado. Se cuenta con sueros de vacas/vaquillonas abortadas y sueros de vacas/vaquillonas no abortadas como controles, obtenidas en el mismo predio, en una relación 1:3. Se utilizaron muestras del año 2024 y 2025. Del total de 153 muestras de suero, 50 provienen de vacas/vaquillonas de rodeos lecheros, y 83 de bovinos de rodeos cárnicos, provenientes de diferentes departamentos del país (fig. 8).

Además, se utilizó un banco de ADN obtenido por UMPI, a partir de muestras de citobrush de bovinos que presentaron problemas en la gestación. Se utilizaron 153 muestras obtenidas entre Enero y Abril del 2025.

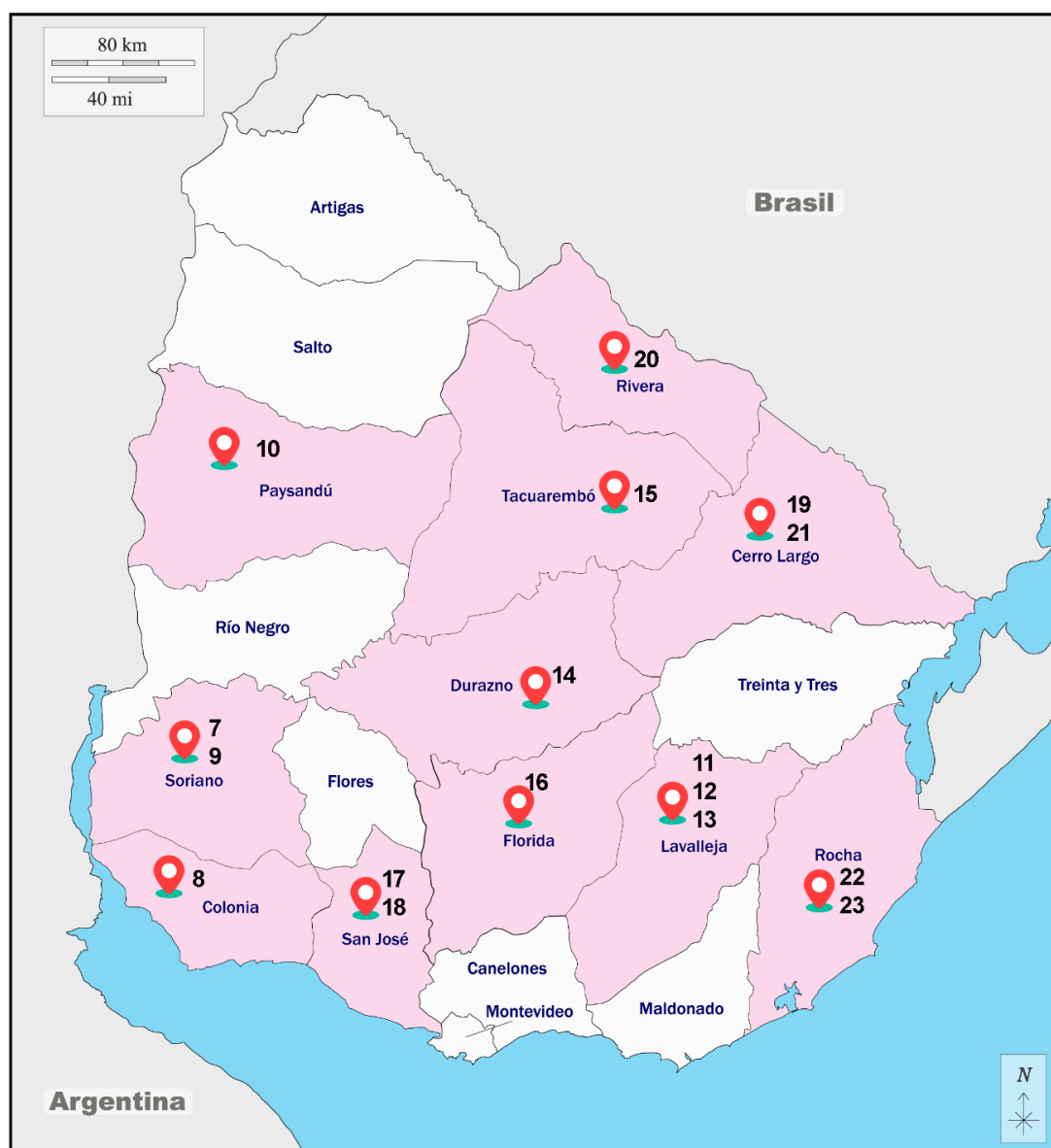


Figura 8. Mapa de Uruguay donde se muestra la localización de los diferentes predios de donde provienen las muestras analizadas por PCR (predios número 15 al 23) y ELISA (predios número 7, 9 y 14). Así como también los predios de donde provienen las muestras analizadas por PCR en el año 2024 (predios número 7 al 15).

3.2 Diagnóstico molecular

3.2.1 PCR a tiempo final

Para el abordaje de la detección molecular del parásito, se utilizó un protocolo de PCR a tiempo final que se utilizaba previamente en el laboratorio.

Los cebadores utilizados fueron descritos previamente (Yamaga et al., 1996). El cebador forward, llamado Np21, cuya secuencia es 5'-GTGCGTCCAATCCTGTAAC-3', tiene una temperatura de annealing de 58°C y 52,6% GC. El cebador reverse o antisentido, llamado Np6, cuya secuencia es 5'-CAGTCAACCTACGTCTTCT-3', tiene una temperatura de annealing de 56°C y 47,4% GC. Se obtiene así un amplicón de un tamaño esperado de 328 pb, del gen Nc5 del genoma de *N. caninum*.

La reacción de amplificación de ADN fue optimizada para un volumen final de 10 µL, que contiene: 5,0 µL de Mango mix (Bioline) 2X; 1,6 µL de cebadores 10 µM; 1,0 µL de ADN genómico y 2,4 µL de agua pura.

Como control negativo se utilizó agua pura en lugar de ADN genómico y como control positivo ADN genómico extraído de aislados de *N. caninum* de la cepa *NcUru1*.

El protocolo térmico estandarizado fue el siguiente: desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C durante 30 segundos y 72°C por 1 minuto, terminando con una extensión a 72°C durante 5 minutos. Se utilizó el termociclador DLAB TC1000-G.

Se utilizó ADN de *N. caninum* de cultivo de la cepa *NcUru1* para determinar la sensibilidad del método a partir de un gradiente de concentración de ADN, de 10 ng/µL a 1,0 pg/µL.

El marcador de peso molecular utilizado fue Thermo Scientific Generuler 1 kb Plus DNA (SM 1331), cuya escala se muestra en la figura 9.

GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder

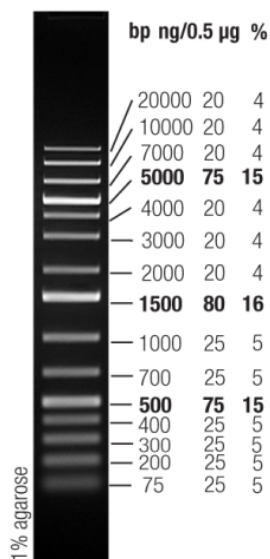


Figura 9. Escalera de ADN de 1 kb GeneRuler Plus (de 75 a 20.000 bp), marcador de peso molecular utilizado en los geles de agarosa donde se visualizaron los productos de PCR. Tomado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM1331>.

3.2.2 Electroforesis en gel de agarosa 1%

Un volumen de 9 µL del producto de PCR se corrió en una electroforesis en gel de agarosa 1%, en buffer TAE (Tris- Acetato- EDTA) 1 X, con 4 µL de reactivo Goodview; a 100 volts durante 15 minutos. Se visualizó con luz ultravioleta en transiluminador (Carestream Gel Logic 112 Imaging System) y se tomaron fotografías utilizando el software del equipo.

3.2.3 Microsatélites

El análisis de microsatélites se realizó con 10 muestras cuyo resultado fue positivo para la PCR realizada y 22 muestras del año 2024 analizadas previamente en el laboratorio, también positivas para PCR. Se utilizaron los marcadores genéticos MS6A, MS6B, MS7, MS8 y MS10. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en Tabla 1. Se optimizó la reacción de amplificación de ADN para un volumen final de 20 µL, que contiene: 10,6 µL de Mango mix (Bioline) 2X; 3,4 µL de cebadores 10 µM; 1,0 µL de ADN genómico y 5,0 µL de agua pura. Para las reacciones de PCR de los marcadores MS7, MS8 y MS10 se utilizó, en lugar de Mango mix, Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific) en el mismo volumen. Las condiciones de ciclado térmico son las mismas y los productos obtenidos se visualizaron y fotografiaron de la misma manera, exceptuando que se cargaron en los

geles 8 μ L de producto de PCR. Se espera un amplicón de 300 pb. Para algunas muestras fue necesario repetir la PCR para el marcador MS10, modificando el volumen de muestra a 3,0 μ L.

Tabla 1. Secuencia y características de los cebadores seleccionados para los ensayos de PCR de tiempo final para microsatélites. Tm: temperatura de melting.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)
MS6A F	TCCGCGTGTGGTTTATCT	53,9
MS6A R	TGCGCATGCACGAATAATAG	53,6
MS6B F	GCACTCATGGGATTTTGTAGG	53,7
MS6B R	AAAAATCAATGCACCTGATCG	51,8
MS7 F	GATCCAACCTCGGCGAGATAC	55,0
MS7 R	CGTTCCCTTCCCAAATCTTC	53,5
MS8 F	ACACTCGCCTTTCCTTTGTG	55,7
MS8 R	CACACAGGCCAGTTGAAA	54,5
MS10 F	CTATCACAGCCGTGAGTGTTG	55,7
MS10 R	CGCGCTATCCTTTATTCT	49,3

Las muestras elegidas según los resultados de PCR obtenidos del análisis de microsatélites, se enviaron a secuenciar por el método de Sanger a Macrogen, Corea.

3.2.4 Análisis de secuencias de microsatélites

Se contaron las repeticiones de cada marcador de microsatélite. Para MS6A, (TA)_n, para MS6B (AT)_n, para MS7 (TA)_n, para MS8 (AT)_n y para MS10 (ACT)_x-(AGA)_y-(TGA)_z (Pedraza-Díaz et al., 2009; Regidor-Cerrillo et al., 2013).

3.3 Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se realizó utilizando un test de ELISA *in house* indirecto que detecta anticuerpos isotipo IgG específicos contra *N. caninum*, desarrollado previamente en el laboratorio.

3.3.1 ELISA *in house* indirecto

Se modificó el protocolo para realizar el ensayo de ELISA *in house*, donde lo que se cambió fue la composición del buffer de revelado.

Todas las muestras de suero se descongelaron a temperatura ambiente. Se sensibilizó la placa de ELISA de 96 pocillos con una solución que contiene 100 ng de proteínas de superficie del parásito, 50 ng de rNcSAG1 (0,411 mg/mL) y rNcSRS2 (0,538 mg/mL). Se incubó a 4°C toda la noche. Se escurrió el contenido y se incubó la placa por 2 horas a temperatura ambiente con 200 µL de solución bloqueante, seroalbúmina bovina al 5% en PBS 1X. Se lavó 3 veces con solución de lavado, Tween 20 al 0,005% en PBS 1X. Se agregaron 100 µL de la muestra de suero diluída 1/100 en la solución bloqueante. Las muestras se analizaron por duplicado. Se incubó por 1 hora a 37°C y se lavó la placa 5 veces con la solución de lavado. Se agregó el segundo anticuerpo, proteína G-HRP, 100 µL por pocillo, en una dilución 1/10.000 en la solución bloqueante. Se incubó 1 hora a 37°C en oscuridad, recubriendo la placa con papel aluminio. Se lavó 7 veces con la solución de lavado y se agregó el buffer de revelado. Este buffer se preparó de la siguiente manera: 12 mL buffer citrato fosfato a pH= 5 (para ello se mezcla 12,85 mL de Na₂HPO₄ 0,2 M con 12,15 mL de ácido cítrico 0,1 M y se agrega agua hasta completar 50 mL), 240 µL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina o TMB 6 mg/mL en DMSO y 96 µL de peróxido de urea 50 mg/µL. Se dejó incubar la placa 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se detuvo la reacción con 50 µL de HCl 3M. Se leyó la absorbancia o densidad óptica de cada pocillo de la placa en espectrofotómetro (BioTek Epoch 2 SN 236729), con filtro de 450 nm.

3.3.2 Análisis estadístico

Gracias a estudios previos que se realizaron en el Laboratorio, se cuentan con sueros analizados en diferentes kits ELISA comerciales y por Western Blot, que se clasificaron como: sueros positivos (n= 19), sueros borderline (n= 21) y sueros negativos (n= 35) (Da Silva Silveira et al., 2020). Estas muestras se utilizaron para determinar el nuevo cut off del ELISA *in house* luego de las modificaciones realizadas al protocolo. Los valores de sensibilidad y especificidad dependen del punto de corte o cut off. Uno de los parámetros que se utiliza para seleccionar el punto de corte es el Índice de Youden (J), que determina el valor donde especificidad y sensibilidad tienen su valor máximo (Fardy, 2009; Yin et al., 2016). Este índice se define como

$J = \max\{\text{Sensibilidad} + \text{Especificidad} - 1\}$. Junto con el valor de J obtenido y la curva ROC realizada, se determinó el valor de *cut-off* o punto de corte. Para la construcción de la curva y el tratamiento de datos, se utilizó el programa GraphPad Prism4.

3.3.3 Western Blot

Las muestras positivas para el test de ELISA se confirmaron mediante la técnica de *Western Blot*. Primero, se corrió 20 µL de extracto de *NcUru1* en electroforesis en gel de poliacrilamida 12% desnaturalizante en buffer de corrida (Tris-Glicina-SDS 10%) durante 1 hora a 200 V y amperaje constante; y 3 µL de marcador de peso molecular de proteínas preteñido PageRuler Plus (Thermo Scientific, Cat. #26619). Se electrotransfirió el gel a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora, a voltaje constante y 300 mA con *buffer* de transferencia (agua purificada, 20% etanol y *buffer* de transferencia 10X). Una vez finalizada la transferencia, se recortó la membrana donde está el gel y se cubrió con Ponceau en un recipiente. Se destiñó la membrana con lavados con agua pura y bloqueó con PBS 1X 5% leche en polvo, overnight a 4°C. Se descartó la leche y se colocó la membrana sobre un vidrio y parafilm para poder recortarla. Se cortaron tiras longitudinales correspondientes a cada carril de cada pocillo del gel, exceptuando el marcador de peso molecular, que se cortó junto con otro carril; y se rotularon. Cada tira se incubó con diluciones de sueros (1:100) en solución de lavado (PBS 1X 0,1% Tween 20 y 0,1% BSA), durante 1 hora, en agitación. Se lavaron las tiras con solución de lavado, 10 minutos con agitación, se repitió el proceso 3 veces. Se colocaron las tiras sobre vidrio y parafilm, se agregó la solución de conjugado (proteína G 1:10.000 en solución de lavado) y se incubó 1 hora. Se lavaron nuevamente las tiras repitiendo el proceso descrito anteriormente. Se colocaron nuevamente las tiras sobre vidrio y parafilm, se agregaron 200 µL de la solución de revelado (SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate, Ref. 34580, Thermo Scientific) sobre cada tira y se incubó en oscuridad por 5 minutos, a temperatura ambiente. Se colocaron las tiras en orden dentro de una bolsa de nylon y se llevaron al fotodocumentador (Amersham ImageQuant 800).

4. Resultados

4.1 Resultados de los análisis moleculares

4.1.1 PCR a tiempo final

La sensibilidad del ensayo de PCR fue de 1,0 pg/μL de ADN genómico de *N. caninum* de la cepa *NcUru1* (fig. 10).

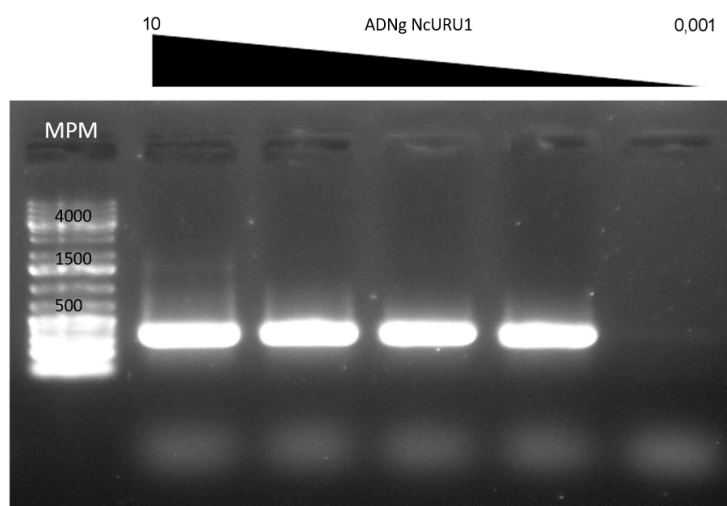


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1 % en buffer TAE 1X, de los productos obtenidos por PCR de diluciones seriadas de ADN genómico de *NcURU1*, desde 10 ng/μL hasta 0,001 ng/μL. A la izquierda, se observa la escala del marcador de peso molecular utilizado, que fue Thermo Scientific Generuler 1 Kb Plus DNA (SM 1331).

Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en geles de agarosa 1% en buffer TAE 1X, y los resultados se muestran en la figura 11.

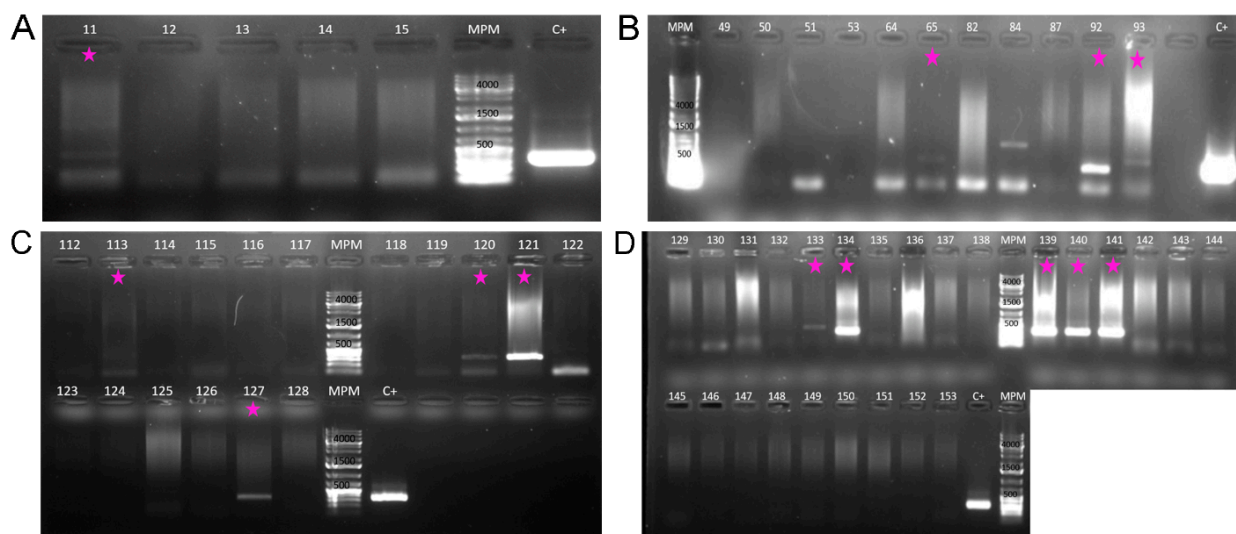


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa 1 % en buffer TAE 1X de productos de PCR obtenidos a partir de muestras de citobrush de ganado bovino de diferentes predios, donde **A)** predio 17. **B)** predio 19 y 21 procedentes del departamento de Cerro Largo. **C)** predios 16, 18, 19 y 20. **D)** predios 19, 21 y 16. Se marcaron con una estrella de color morado las muestras positivas. **MPM** corresponde al marcador de peso molecular utilizado, que fue Thermo Scientific Generuler 1 kb Plus DNA (SM 1331). **C+** corresponde al control positivo de la reacción de PCR, en que se utilizó como molde ADN genómico de *NcURU1*.

ADN de *N. caninum* se detectó en un 15 % (23 de 153 muestras, $IC_{95\%}$ 10,2 % - 21,5 %) (fig. 12).

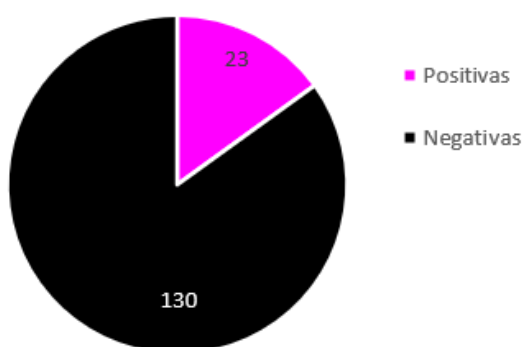


Figura 12. Resultados obtenidos del análisis por PCR de 153 muestras de citobrush de bovinos de carne.

Las muestras analizadas provienen de diferentes predios, numerados del 15 al 23, localizados en diferentes regiones del país (fig. 8), para los cuales se muestran los resultados obtenidos en la Tabla 2 y figura 13. Sólo en dos predios, el 15 y el 18, todas

las muestras analizadas resultaron negativas, por lo que en un 77,8% de los predios donde se obtuvieron muestras, se pudo detectar la presencia del parásito.

Tabla 2. Resultados obtenidos de PCR de muestras de citobrush de bovinos de carne, clasificadas por predio, y la prevalencia calculada para cada uno de los predios.

Predio	Muestras analizadas	Muestras positivas	Prevalencia
15	5	0	0 %
16	26	3	11,5 %
17	18	1	5,5 %
18	9	0	0 %
19	43	10	23,2 %
20	15	2	13,3 %
21	25	5	20 %
22	7	1	14,2 %
23	2	1	50 %
21 o 20	3	0	0 %
Total	153	23	15 %

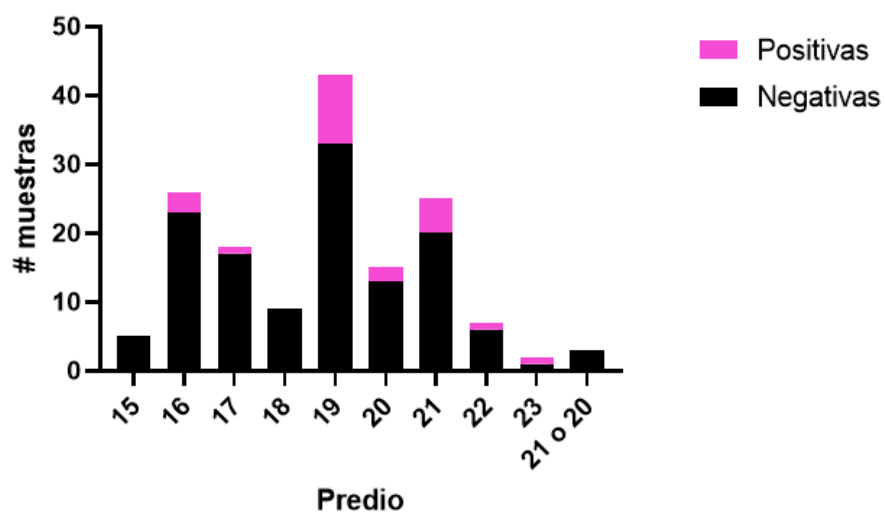


Figura 13. Resultados de análisis por PCR de ADN extraído de muestras de citobrush de ganado bovino cárnico, en función de los predios de donde provienen las muestras.

Luego de obtener algunos resultados de amplificaciones inespecíficas y múltiple bandeo, se comenzó a cuantificar el ADN en las muestras, utilizando Nanodrop, y cuyos valores obtenidos se muestran en la Tabla 6 del Anexo 1.

4.1.2 Microsatélites

Los productos de PCR que se obtuvieron utilizando cebadores específicos para amplificar cada marcador de microsatélite se corrieron en geles de agarosa 1% en buffer TAE 1X (fig. 14). Los datos de las muestras seleccionadas para dichas rondas de amplificación, como número de identificación del bovino, predio y departamento, se muestran en Tabla 9 en el Anexo 4.

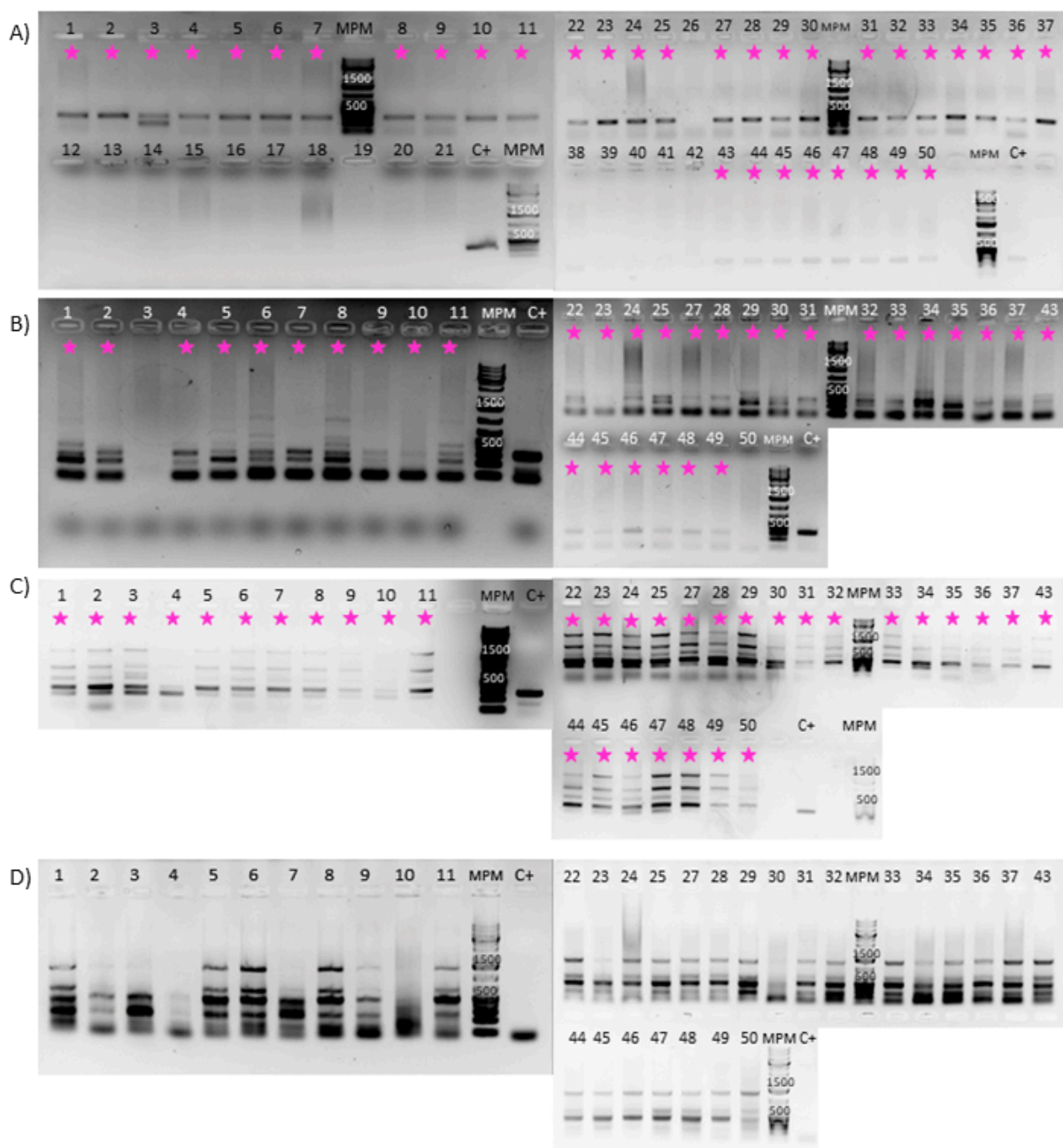


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa 1% de productos de PCR obtenidos de amplificaciones de marcadores moleculares de microsatélites, a partir de muestras de ganado bovino de carne positivas para PCR de *N. caninum* con cebadores Np6 y Np21. **A)** MS6A; **B)** MS6B; **C)** MS7; **D)** MS8. **MPM** corresponde al marcador de peso molecular utilizado, que fue Thermo Scientific Generuler 1 kb Plus DNA (SM 1331). **C+** corresponde al control positivo de la reacción de PCR, en que se utilizó como molde ADN genómico de *NcURU1*. La estrella de color rosa indica resultado positivo de la PCR.

Si bien se observó múltiple bandeo en la mayoría de las muestras amplificadas, se consideraron muestras positivas cuando se encontrara la banda de tamaño esperado (300 pb) y el control positivo de la reacción de PCR estuviera amplificado. Para el microsatélite MS8, no se logró amplificar el control, aunque la banda de 300 pb se

observó en la mayoría de las muestras corridas en el gel y en la Tabla 9 se marcó como un resultado positivo. Estas muestras no se enviaron a secuenciar.

En el caso del marcador molecular número 10, fue necesario repetir la PCR para algunas muestras, con 3 μ L de muestra en la mezcla de reacción, que resultaron dudosas y en la repetición se obtuvieron resultados positivos (fig. 15).

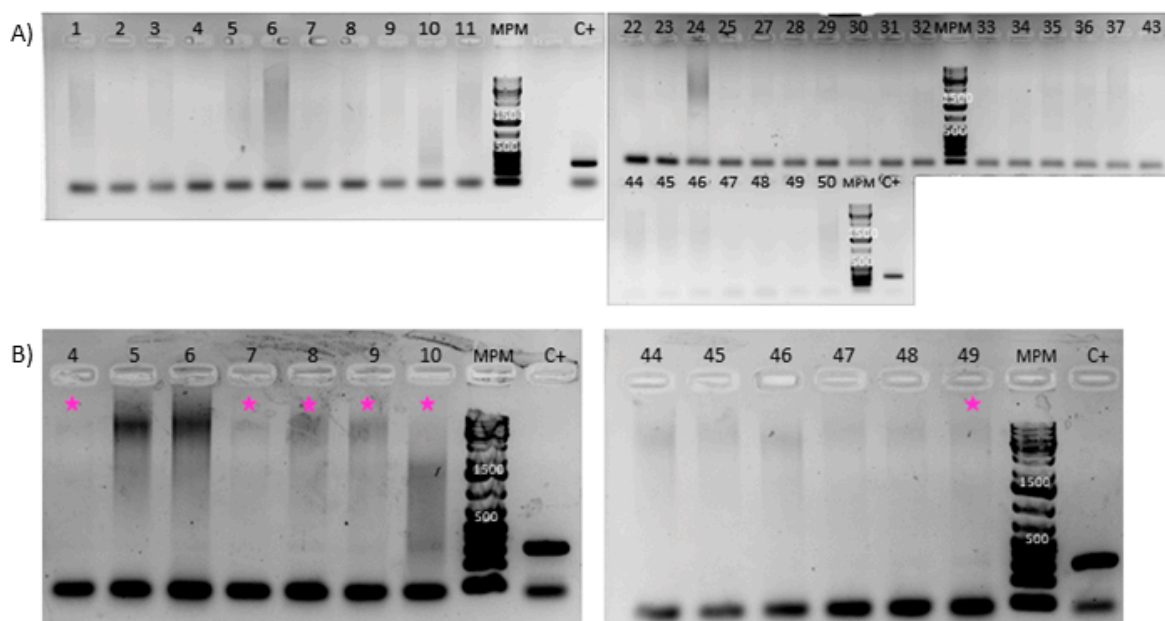


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa 1 % de productos de PCR obtenidos de amplificaciones del marcador molecular número 10, a partir de muestras de ganado bovino de carne positivas para PCR de *N. caninum* con cebadores Np6 y Np21. **A)** MS10; **B)** repetición de algunas muestras dudosas de MS10. **MPM** corresponde al marcador de peso molecular utilizado, que fue Thermo Scientific Generuler 1 kb Plus DNA (SM 1331). **C+** corresponde al control positivo de la reacción de PCR, en que se utilizó como molde ADN genómico de *NcURU1*. La estrella de color rosa indica resultado positivo de la PCR.

Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionaron para enviar a secuenciar, 33 muestras del marcador molecular 6A, 13 muestras del 6B, 8 muestras de MS7 y 6 muestras de MS10. Una vez obtenidas las secuencias por el método de Sanger, se contaron los repetidos para cada marcador (Tabla 3).

Tabla 3. Número de repeticiones de cada marcador molecular del análisis de secuencias de microsatélites de *N. caninum*.

Predio	Departamento	N° de muestra	Repeticiones de marcadores de microsatélites			
			6A	6B	7	10
7	Soriano	24	13			
		25	13			
		33	11	N/A		
		36	13		N/A	
8	Colonia	32	12			
9	Soriano	27	12	10		
		28	12	12		
		43	12		N/A	
		47	11	12		
		48	12	N/A		
10	Paysandú	29	12			
		30	12			
		37	12		N/A	
		46	11	12		
11	Lavalleja	35	12		N/A	
12		45	12	N/A		
13		49	12	12		N/A
14	Durazno	23	12	N/A		
		31	11	N/A		
		50	10			
15	Tacuarembó	34	12		9.1	
		44	12	N/A		
17	San José	1	11			
19	Cerro Largo	9	12	N/A	N/A	N/A
		10	11	N/A	9.1	6.15.9
		11	12			
20	Rivera	4	12		9.1	5.10.8
21	Cerro Largo	5	10			
		6	12			
		7	12			N/A
		8	11			N/A
22	Rocha	2	11			

A pesar de los esfuerzos realizados y las repeticiones en las reacciones de PCR, no fue posible obtener para todas las muestras, productos de PCR que se pudieran enviar a secuenciar de los 5 marcadores moleculares.

Muchas de las secuencias obtenidas, mostraron múltiples señales en el cromatograma para una misma muestra, sin poder diferenciarlas ni analizarlas para su conteo. En la Tabla 3 dichas secuencias se marcaron como N/A (no analizables).

En cuanto al marcador molecular MS6A, se puede observar que circulan múltiples variantes dentro de los predios analizados, como en el predio 21 en Cerro Largo, que circulan 3 variantes para este marcador, con 10, 11 y 12 repeticiones de la secuencia “TA”. En Soriano, también se observa la co-circulación de variantes genéticas de *N. caninum* dentro de los predios analizados, con cantidad de repeticiones similares a las cepas ya reportadas de Uruguay y de Argentina (Cabrera et al., 2019).

En el caso de MS6B, de la mayoría de las muestras que se enviaron a secuenciar, se obtuvieron secuencias con superposición de señales en el cromatograma, sin poder analizarlas.

Para MS7, se encontraron 9 repeticiones de la secuencia “TA” y una inversión en la misma a “AT”, en los tres departamentos en los que se pudo analizar. Estos departamentos, linderos, se ubican en la región noreste del país, compartiendo frontera con Brasil, y esta variante ha sido reportada en el vecino país también.

Al analizar el marcador molecular MS10, los repetidos con el patrón 6.15.9 que se encontraron, coinciden con variantes de cepas uruguayas como NcUru1, NcUru3 y NcUru4 ya reportadas (Cabrera et al., 2019) y de Argentina.

De las secuencias que se pudieron analizar, se puede concluir que, en ganado bovino de carne de nuestro país, circulan las mismas variantes genéticas que en ganado bovino lechero, como se reportó en Cabrera et al., 2019, y de la región.

4.2 Resultado de los análisis serológicos

4.2.1 Determinación de valor de cut-off

El punto de corte o cut-off del ELISA *in house* calculado fue de 1,289, con especificidad de 93,33% (CI_{95%}; 78,68% - 98,82%) y sensibilidad de 93,33% (CI_{95%}; 82,14% - 97,71%). Siendo Sensibilidad la probabilidad de que la prueba detecte a los verdaderos positivos y Especificidad la probabilidad de que la prueba detecte a los verdaderos negativos de un test diagnóstico. Dado que el índice de Youden calculado fue $J = 0,9032$, correspondiente a una densidad óptica (DO) $DO = 1,414$, con especificidad de 93,33% y sensibilidad de 100%; y considerándose que este valor es muy estricto, el valor de cut off para el test ELISA *in house* luego de las modificaciones en el protocolo se estableció como $DO = 1,289$.

Este punto de corte coincide con el punto de corte entre los gráficos de sensibilidad y especificidad en función de la densidad óptica (fig. 16).

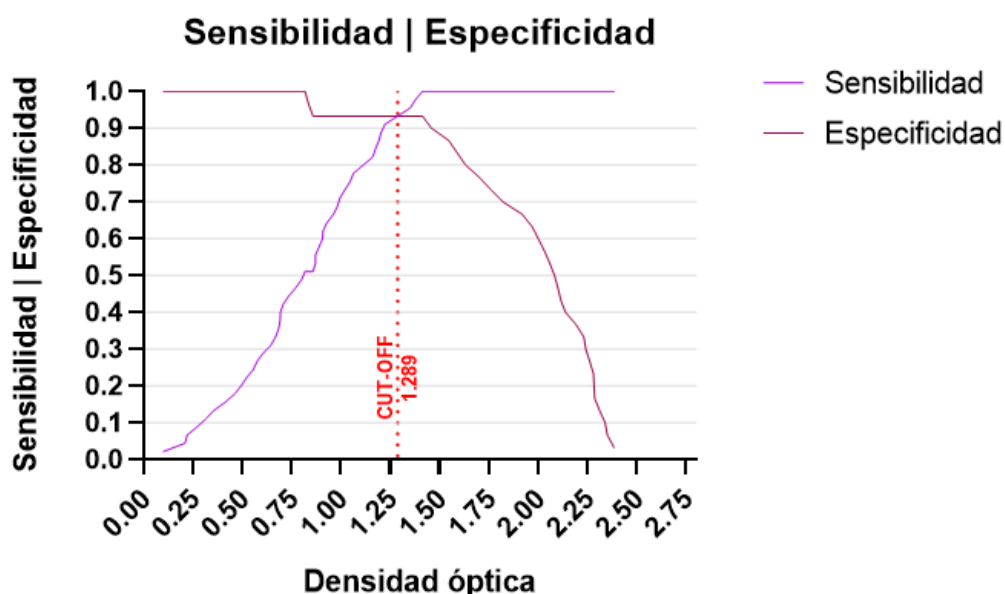


Figura 16. Curvas de Sensibilidad y Especificidad según la Densidad Óptica. La línea roja punteada indica el punto de corte (cut-off) en una densidad óptica de 1,289, donde se intersectan los valores de sensibilidad y especificidad.

Se realizó la curva ROC (fig. 17) para evaluar el rendimiento del test, donde se representa la sensibilidad (eje Y) frente a la especificidad (eje X, expresada como $100 - \% \text{ de especificidad}$). El AUC (Área bajo la curva) de 0,9674 indica un excelente rendimiento del test, ya que un valor cercano a 1,0 sugiere una alta capacidad para distinguir entre los verdaderos positivos y los verdaderos negativos. La línea de puntos

verde representa un rendimiento aleatorio del 50%, mientras que la línea punteada roja indica el punto de corte óptimo para el test.

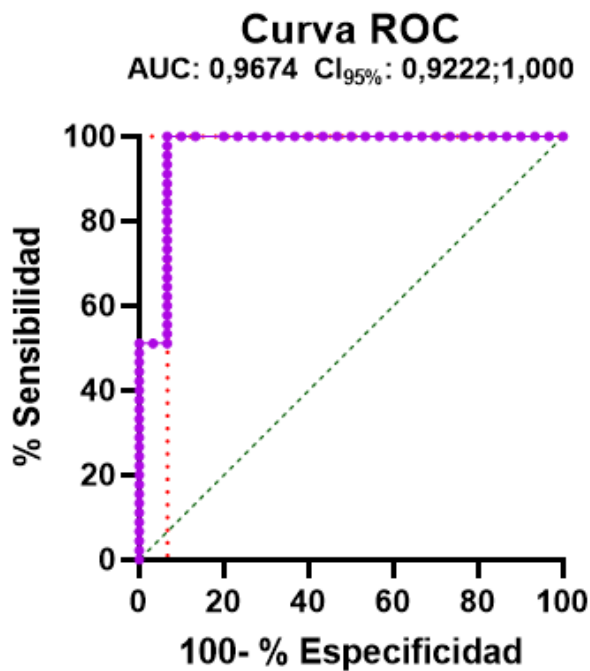


Figura 17. Curva ROC. Se representa la relación entre la sensibilidad (eje Y) y la especificidad (eje X, calculada como 100 - % especificidad). El AUC (Área bajo la curva) es de 0,9674, con un intervalo de confianza (CI_{95%}) del 92,2% al 100%.

4.2.2 Análisis de sueros

De las 50 muestras analizadas provenientes de bovinos de tambo, 14 de ellas resultaron positivas para el test ELISA realizado (fig. 18). La prevalencia fue de 28% (IC_{95%} 17,5% - 41,7%).

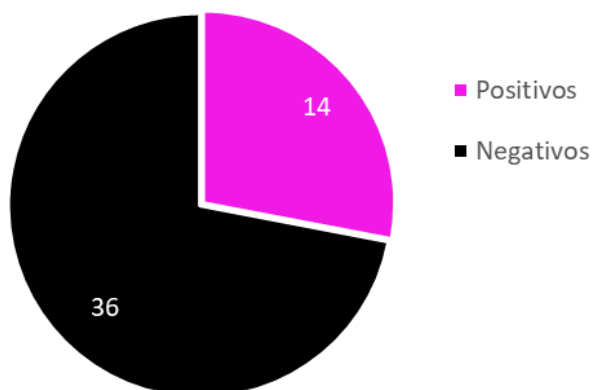


Figura 18. Resultados obtenidos del test ELISA de 50 muestras de suero de bovinos provenientes de tambo.

Se muestra la dispersión de los valores obtenidos de absorbancia medidos a 450 nm como resultado de la lectura de placas de ELISA, realizados con muestras de suero de bovinos de tambo (fig. 19). El valor de cut-off establecido, permite diferenciar claramente las muestras positivas y negativas.

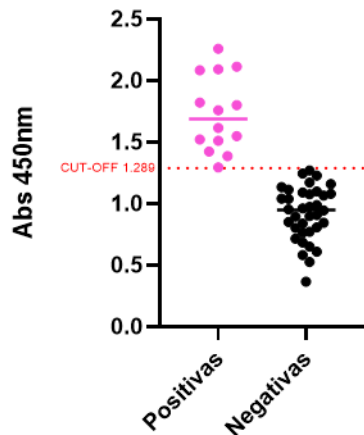


Figura 19. Distribución de las lecturas de absorbancia a 450 nm obtenidas de la lectura de placas de ELISA realizadas con muestras de suero de bovinos de tambo. El gráfico de puntos muestra la dispersión de los valores para las muestras clasificadas como positivas (en rosa) y negativas (en negro). La línea de puntos roja indica el punto de corte (cut-off) en 1,289.

El análisis de las muestras de suero provenientes de ganado bovino de carne dio como resultado 9 muestras positivas y 74 negativas (fig. 20). Por lo tanto, la seroprevalencia fue de 12,2% (IC_{95%} 5,8% - 19,3%).

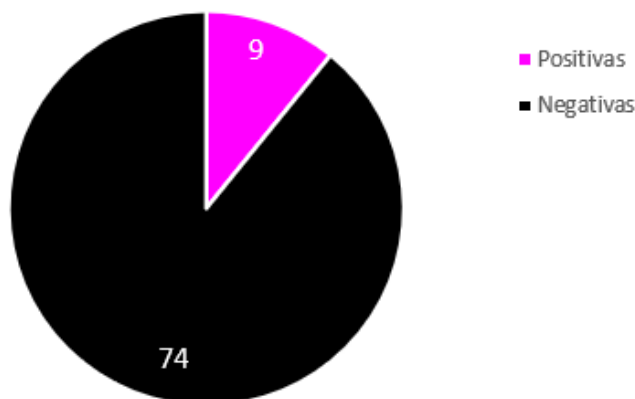


Figura 20. Gráfica de los resultados obtenidos de los sueros analizados, provenientes de bovinos de rodeos cárnicos, con el test ELISA *in house*.

Analizando la dispersión de los valores de DO obtenidos al leer las placas de ELISA (fig. 21), se puede observar que el valor de cut-off calculado, separa las muestras positivas y negativas de manera clara, sin superposición de valores.

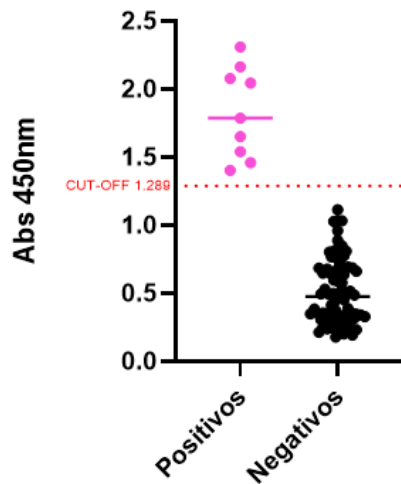


Figura 21. Gráfica de puntos donde se muestra la dispersión de los valores de DO para las muestras de suero de bovinos de carne, clasificadas como muestras positivas (en rosa) y negativas (en negro). La línea de puntos roja indica el punto de corte (cut-off) en 1,289.

Estas muestras analizadas provienen de vacas que sufrieron abortos y vacas control, es decir, vacas que no sufrieron aborto. De los 9 resultados positivos, 8 eran muestras de vacas abortadas. En cuanto a las muestras control, 61 de ellas dieron negativo y 1 positiva para el test ELISA (fig. 22).

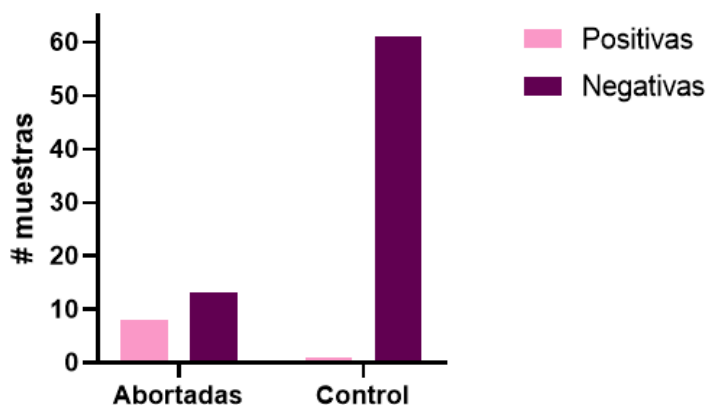


Figura 22. Comparación del número de muestras de suero de bovinos de carne con un resultado positivo o negativo para el test ELISA *in house*. Las barras muestran los resultados para dos grupos: vacas que sufrieron abortos (Abortadas) y vacas que no tuvieron abortos (Control).

Estas muestras de suero de bovinos de carne que se analizaron, provienen de 3 predios diferentes, predios 7, 9 y 14; ubicados en los departamentos de Soriano y Durazno (fig. 8).

En cuanto al predio 7, de un total de 24 muestras analizadas, 6 muestras resultaron positivas para el test ELISA detectando anticuerpos contra *N. caninum* (fig. 23).

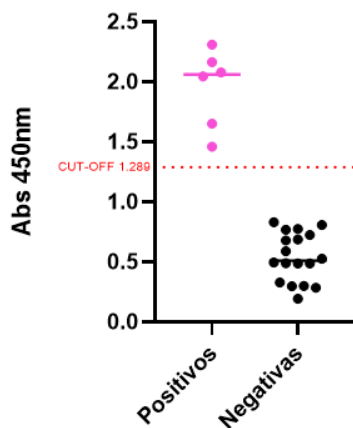


Figura 23. Gráfica de puntos donde se muestra la dispersión de los valores de DO para las muestras de suero de bovinos de carne tomadas en el predio 7, clasificadas como muestras positivas (en rosa) y negativas (en negro). La línea de puntos roja indica el punto de corte (cut-off) en 1,289.

Entre las muestras positivas, 5 corresponden a muestras provenientes de vacas/vaquillonas que sufrieron abortos mientras que del grupo control se obtuvo 1 sola muestra positiva.

En el predio 9, las 3 muestras que dieron resultados positivos provienen de vacas abortadas (fig. 24).

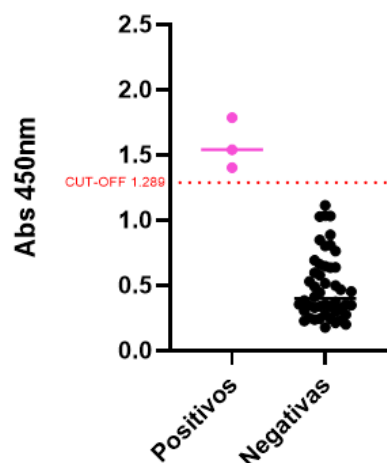


Figura 24. Gráfica de puntos donde se muestra la dispersión de los valores de DO para las muestras de suero de bovinos de carne tomadas en el predio 9, clasificadas como muestras positivas (en rosa) y negativas (en negro). La línea de puntos roja indica el punto de corte (cut-off) en 1,289.

En el predio 14 no se obtuvieron resultados positivos en el test ELISA realizado (fig. 25).

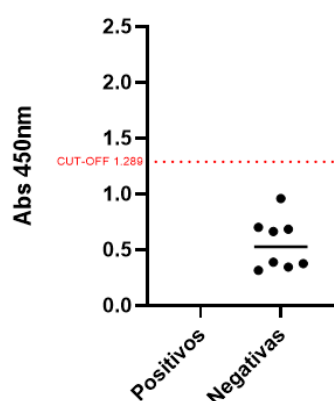


Figura 25. Gráfica de puntos donde se muestra la dispersión de los valores de DO para las muestras de suero de bovinos de carne tomadas en el predio 14, clasificadas como muestras positivas (en rosa) y negativas (en negro). La línea de puntos roja indica el punto de corte (cut-off) en 1,289.

En la tabla 4 y fig. 26 se resumen los resultados obtenidos del análisis de 83 muestras de suero provenientes de bovinos de carne de tres predios diferentes.

Tabla 4. Resultados obtenidos del análisis a través de test ELISA, de muestras provenientes de sueros de bovinos de carne del predio 7, 9 y 14.

Predio 7		
Positivas	Abortadas	5
	Control	1
Negativas	Abortadas	1
	Control	17
Predio 9		
Positivas	Abortadas	3
	Control	0
Negativas	Abortadas	10
	Control	38
Predio 14		
Positivas	Abortadas	0
	Control	0
Negativas	Abortadas	2
	Control	6

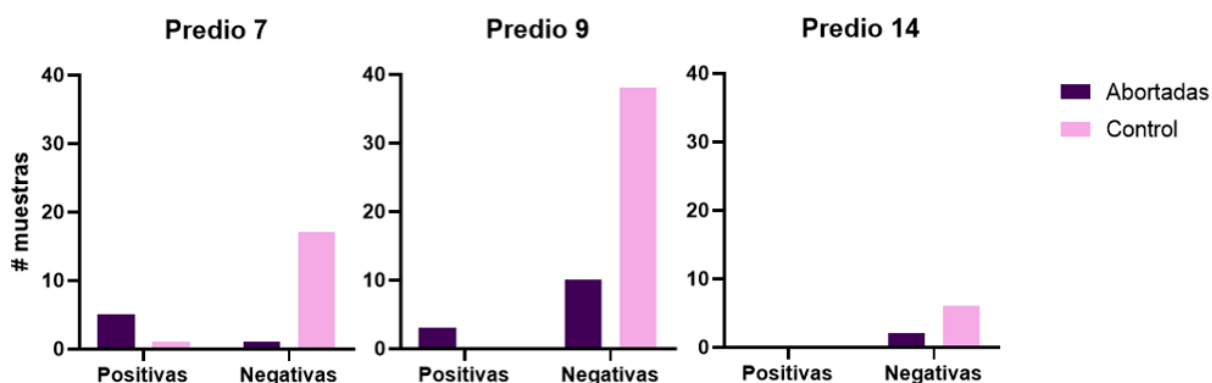


Figura 26. Representación gráfica de los resultados obtenidos del análisis con test ELISA de muestras de suero de bovinos de carne, provenientes de los predios 7, 9 y 14.

De los 3 predios analizados en este estudio, se obtuvieron resultados positivos en dos de ellos, siendo la seroprevalencia del rebaño en los rodeos cárnicos uruguayos de 66,67 %.

En cuanto a la seroprevalencia individual de los predios, se obtuvo que para el predio 7 fue de 25,00 %, para el predio 9 fue de 5,88 %.

Las muestras analizadas que resultaron positivas para el test ELISA *in house*, se confirmaron por Western Blot (fig. 27). Todas las muestras analizadas resultaron positivas, verificando los resultados positivos obtenidos en los enzimoimmunoensayos realizados. La muestra negativa para el test ELISA *in house*, carril numerado como 6

en la fig. 27, utilizado como control negativo en el Western Blot, mostró un patrón diferente de bandeo con respecto al resto de las muestras positivas. En la imagen se puede observar un patrón más intenso en las bandas superiores, de mayor peso molecular con respecto al patrón de las bandas esperadas, correspondientes a rNCSRS2 y rNCSAG1.

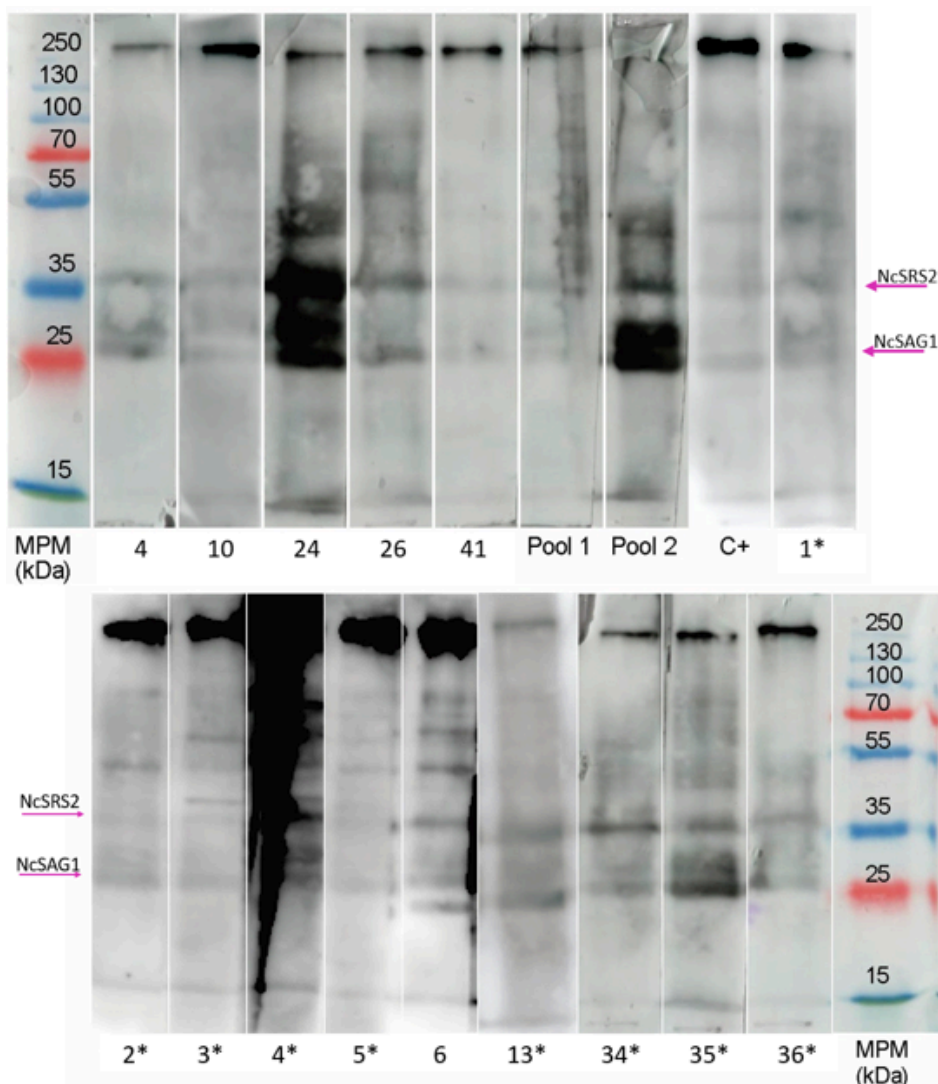


Figura 27. Resultados de Western Blot de muestras que resultaron positivas para el test ELISA *in house*, de suero de bovinos de carne y de tambo (marcadas con un *). Cada carril numerado corresponde a una muestra individual, mientras que Pool 1 y Pool 2 representan mezclas de muestras. El Pool 1 contiene las muestras 1, 11, 13, 35 y 37. El Pool 2 contiene las muestras 38, 39, 48 y 50. Las referencias de las muestras se encuentran en Anexo 2 y 3. El carril "C+" es un control positivo (se utilizó un suero positivo de los utilizados para calcular el cut-off del test, rotulado como 6A), y "MPM (kDa)" se refiere al marcador de peso molecular de proteínas preteñido (en kilodaltons) utilizado, PageRuler Plus (Thermo Scientific, Cat. #26619). La muestra 6 corresponde a una muestra con resultado negativo para el test ELISA *in house*. Las bandas oscuras indican la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* presentes en el suero que reaccionan contra las proteínas presentes en el extracto de *NcUru1*.

5. Discusión

Neospora caninum es el agente causal de la neosporosis bovina, enfermedad que provoca pérdidas millonarias a nivel regional y mundial debido a los patrones de abortos en rodeos como consecuencia de la misma. No hay una vacuna para su cura ni fármacos efectivos y seguros disponibles en el mercado para el tratamiento de la misma. El diagnóstico etiológico es complejo por diversos factores explicados anteriormente, por lo que los métodos de diagnósticos serológicos y moleculares son indispensables para la detección de este parásito.

El primer reporte de *N. caninum* en nuestro país fue en 1997, en perros (Barber et al., 1997b). En bovinos, se reportó la presencia del parásito en fetos abortados (Bañales et al., 1998), posteriormente múltiples estudios reportaron seroprevalencias elevadas y se encontró correlación positiva entre la seropositividad y el aborto bovino. Desde hace mucho tiempo la neosporosis afecta la producción agropecuaria y por ende la economía del país. Actualmente, con mayor información disponible y con métodos de diagnóstico disponibles que no se realizan con cepas de la región, es imperioso el desarrollo de test de diagnóstico, como ELISA o puesta a punto de PCR, que incluyan las cepas regionales, mejorando sensibilidad y especificidad de los mismos.

Sobre los resultados obtenidos de análisis moleculares, se logró reportar por primera vez, la presencia de ADN de *N. caninum* a partir de una muestra de citobrush del tracto reproductor bovino. En cuanto a los valores de prevalencia de la enfermedad obtenidos, nuestros resultados están en línea con los datos reportados anteriormente en nuestro país. A nivel individual, la prevalencia obtenida fue de 15% (IC_{95%} 10,2% - 21,5%). A nivel de rebaño en los rodeos de bovinos cárnicos fue de 77,8%. La neosporosis continúa siendo una enfermedad endémica en el país. Se logró caracterizar parcialmente, a nivel genético, las variantes circulantes de *N. caninum* detectadas por PCR, utilizando microsatélites. Con los cuatro marcadores moleculares que logramos obtener PCR positivas y viables para secuenciar, se obtuvieron secuencias analizables y otras no analizables, por la multiplicidad de señales en el cromatograma de una misma muestra. Esto lleva a considerar que no es viable enviar el producto de PCR a secuenciar, ya que el múltiple bandeo que observamos en los

geles de agarosa también se reflejó en las múltiples señales en el cromatograma de una misma muestra. Es necesario mejorar la calidad de ADN antes de enviar a secuenciar, por ejemplo, recortando la banda del gel de agarosa deseada, purificando el ADN con algún kit comercial y ese ADN obtenido enviarlo a secuenciación.

De las secuencias que se pudieron analizar y contar los repetidos característicos de cada marcador molecular, se puede concluir que las cepas circulantes de *N. caninum* son similares en ganado bovino de carne y de leche, como se ha reportado anteriormente (Cabrera et al., 2019).

Dada la variabilidad genética de *N. caninum*, descrita anteriormente, y por lo tanto la variabilidad antigénica, el desarrollo de un test ELISA realizado con antígenos de superficie de NcURU1, como en el caso de las proteínas recombinantes rNcSRS2 y rNcSAG1 utilizadas en el test ELISA *in house* que se quiere validar en la presente tesis, modifica positivamente la sensibilidad y especificidad del método de diagnóstico. Las proteínas de superficie de parásitos intracelulares obligados desempeñan un rol crítico en la infección, ya que reconocen receptores en la superficie de la célula hospedadora y representan el punto inicial de contacto con los componentes del sistema inmune del hospedador (Hemphill et al., 1999). El test ELISA *in house* utiliza la combinación de dos proteínas de superficie del parásito, siendo que NcSRS2 está presente tanto en taquizoítos como bradizoítos, mientras que NcSAG1 solo en taquizoítos. Si bien no es posible diferenciar entre una infección aguda o crónica a través de este método de diagnóstico, permite obtener información sobre si el bovino analizado está infectado o no con *N. caninum*.

Los kits comerciales disponibles son realizados mayoritariamente con cepas europeas, y ha sido demostrado que disminuye los resultados seropositivos de las muestras analizadas procedentes de nuestro país o región. Además, los tiempos de importación y costos de los kits, son factores que afectan la disponibilidad de los mismos. Por estos motivos, existe la necesidad de contar con kits de diagnósticos locales o regionales, que además de mejorar la sensibilidad y especificidad de la técnica, llevaría a reducir costos. Basados en los resultados obtenidos en el presente trabajo, sería aplicable el uso de la prueba ELISA *in house* para relevamientos epidemiológicos en escala y determinar la presencia de la enfermedad en rodeos del Uruguay. Fomentar la producción de pruebas diagnósticas elaboradas y evaluadas localmente, resulta una alternativa práctica en términos económicos y diagnósticos, siendo aplicable su uso a campañas de control y prevención de la neosporosis a nivel nacional. Así como

también es necesario una mayor difusión de información, enseñar tanto a dueños de establecimientos como personal que trabaja en los mismos, sobre neosporosis y las medidas de bioseguridad que pueden aplicarse. Entre ellas, medidas para disminuir la transmisión horizontal por la ingesta de ooquistes, a través de agua o alimento contaminado; el efecto de los perros y la fauna silvestre que también son parte del ciclo del parásito; cómo evitar la transferencia horizontal al no reproducir vacas/vaquillonas infectadas o la inserción en rodeos de bovinos que sean seronegativos. El conocimiento sobre la enfermedad y su prevención es fundamental para evitar la propagación de la misma. Estas medidas de bioseguridad o difusión de información, no implican altos costos ni para productores ni para organismos del Estado que se encarguen de ello, y aplicadas correctamente, disminuirían las altas pérdidas económicas que la neosporosis causa en Uruguay.

De esta manera, se mejoraría la detección del parásito, permitiendo universalizar el acceso al diagnóstico y gestión adecuada de la enfermedad en los rodeos de ganado, tanto lecheros como cárnicos.

Se han propuesto diferentes estrategias de control basadas en la relación costo/beneficio a nivel de rodeo. Si la prevalencia en un rodeo fuera baja, podría ser más caro tratar de eliminar la enfermedad que convivir con ella. No obstante, para rodeos con prevalencias mayores a 21%, se considera tomar medidas. Como no se cuenta con vacunas ni tratamientos con medicamentos efectivos para el control de la neosporosis bovina, las medidas de control se basan exclusivamente en medidas de manejo, como evitar la transmisión horizontal, la eliminación de los fetos abortados y placentas para evitar la ingestión de tejidos infectados con *N. caninum* por parte de hospederos definitivos y evitar la propagación del ciclo entre animales silvestres. En cuanto a la transmisión vertical, se recomienda la no reproducción de animales seropositivos, la reposición de animales seronegativos y la eliminación de animales seropositivos, sólo si la prevalencia es baja (Campero, C.M., 2014). Se debe considerar que dentro de las pérdidas económicas, además de las relativas al aborto, hay gastos de diagnóstico y honorarios profesionales, el costo de la eliminación de la vaca/vaquillona abortada, la disminución en la producción láctea, el aumento del intervalo entre partos, la compra de nuevos bovinos para reposición y la lista continúa. Para un rodeo pequeño, con baja prevalencia, seguramente sea menos perjudicial, en términos económicos, convivir con la neosporosis. En aquellos rodeos donde la infección es endémica y la seroprevalencia es elevada, la cría de los propios terneros

de reemplazo es un riesgo potencial. Así como también la introducción de nuevas vacas/vaquillonas al rodeo para aumentar su número sin ser testeadas y sin saber si son seronegativas. También cabe recordar que las vacas/vaquillonas seropositivas tienen mayor riesgo de aborto, se ha reportado una asociación positiva entre positividad de anticuerpos para *N. caninum* en vacas y abortos (Kashiwazaki et al., 2004).

Si se comparan los valores obtenidos de sensibilidad y especificidad del ELISA *in house* con los valores de los kits comerciales, se puede observar que son similares (Tabla 5). Estos resultados aumentan la robustez del test, brindando confianza a los resultados obtenidos con el mismo, validando el uso del test desarrollado *in house* como herramienta de diagnóstico para la neosporosis bovina.

Tabla 5. Datos de especificidad y sensibilidad de los diferentes test ELISA utilizados previamente para analizar los sueros de bovinos de rodeos lecheros y del test ELISA *in house*.

Test ELISA	Especificidad, 95% (CI)	Sensibilidad, 95% (CI)
ELISA <i>in house</i>	93,3 (78,7-98,8)	93,3 (82,1-97,7)
HIPRA-CIVTEST	96,1 (93,9-98,4)	100 (100-100)
LSI Bov	99,3 (98,2-100)	94,1 (90,7-97,5)
LSI Rum	99,6 (99,0-100)	93,0 (89,3-96,7)
BIO-X	98,9 (97,6-100)	94,9 (91,7-98,2)

Además, el análisis ROC determinó que la prueba de ELISA *in house* fue altamente precisa (AUC= 0,9674) (Swets, 1988).

Como se explica en Wei et al., 2022; la prueba ELISA ofrece varias ventajas, como su facilidad de uso, su rentabilidad y la capacidad de analizar rápidamente un gran número de muestras. Además, las pruebas serológicas pueden detectar anticuerpos, incluso en las primeras etapas de la infección, lo que proporciona información valiosa para gestionar y controlar la propagación de *N. caninum* en los rebaños. Esto es especialmente importante en regiones con altas tasas de prevalencia, donde la detección e intervención tempranas pueden mitigar las pérdidas económicas asociadas con el aborto bovino, junto con las medidas de bioseguridad recomendadas.

Se determinó un nuevo punto de corte para el ELISA *in house* luego de modificar el método de revelado del test, cut off= 1,289, con valores de sensibilidad y especificidad de 93,3%. Como se pudo observar en la figura 17, el valor de cut-off determinado permite una clara separación entre las muestras positivas y negativas, diferenciando claramente ambos grupos.

Al analizar las muestras seropositivas con Western Blot, se detectó que las reacciones hacia los antígenos ocurrieron en el 100% de los sueros positivos, destacando la importancia de ambos antígenos en las infecciones de *N. caninum* y en el diagnóstico de la enfermedad en bovinos. Es recomendable utilizar la técnica de Western Blot como prueba confirmatoria para muestras con resultados dudosos para ELISA, ya que los resultados de Western Blot son considerados inequívocos. La prueba de ELISA *in house* ha demostrado un buen desempeño y una adecuada performance para el diagnóstico de la neosporosis bovina en Uruguay. Pero es necesario continuar con el análisis de muestras de suero para obtener un valor de seroprevalencia más ajustado a la realidad del país. Restan departamentos donde no se han analizado muestras, y en el banco de sueros de UMPI aún quedan muestras para seguir analizando. Cuanto mayor sea el número de sueros analizados con el test, más certera será la información que se obtenga sobre la circulación del parásito en el país. De todos los predios analizados, tanto por PCR como con el test ELISA *in house*, 9 de 12 resultaron con animales positivos para *N. caninum*. El parásito está ampliamente distribuido en el sur del país, de donde provienen la mayoría de las muestras analizadas en este trabajo.

Los valores de seroprevalencias obtenidos con el ELISA *in house*, a nivel predial, fue de 66,67% para bovinos de carne. Si bien el número de predios analizados (n= 3) es pequeño y no permite mayores análisis estadísticos, el valor de prevalencia obtenido es menor al reportado por (Da Silva Silveira et al., 2020), factor que podría estar afectado por el pequeño número de predios analizados. Es necesario continuar analizando más muestras de suero, de diferentes predios, para poder tener un número que sea estadísticamente suficiente para otros tipos de análisis y así mejorar los resultados. Como ya ha sido reportado en estudios seroepidemiológicos previamente en nuestro país, la prevalencia de anticuerpos anti *N. caninum* varía entre 86,5% y 96% en establecimientos de ganado de carne y leche, respectivamente, con prevalencias individuales de 22,3% en ganado lechero y 14,3% en ganado de carne.

Si se compara la seroprevalencia en animales de rodeos lecheros con los animales de rodeos cárnicos, la misma es mayor en tambos que en rodeos de carne. Un factor que influye en la mayor prevalencia de la enfermedad en los tambos, es el menor recambio de animales que ocurre en los mismos. Las vacas/vaquillonas de tambo, están años en el predio, y su descendencia pasa a formar parte del mismo rebaño. Si a esto se agrega la efectividad de la transmisión vertical y que hay terneros que nacen ya infectados crónicamente, aunque no muestren signos de la enfermedad, todos estos factores colaboran con el hecho de que la prevalencia en tambos es mayor que en rodeos cárnicos. En cambio, en los rodeos donde los bovinos que se crían están destinados a engorde y venta para la producción de carne, el recambio es muy frecuente. El bovino está en el predio el tiempo mínimo necesario para engordar hasta llegar a los kilos deseados para su venta.

El objetivo específico número cuatro, no pudo cumplirse, ya que las muestras utilizadas para PCR y ELISA no son de la misma procedencia, por lo que no es posible comparar resultados. *N. caninum* no se encuentra en sangre, por lo que no es posible hacer PCR a partir de las muestras de suero bovino. Y a partir de muestras de citobrush no es posible realizar enzimoimmunoensayos. Ambas técnicas utilizadas son útiles para la detección de *N. caninum*, la PCR detecta de manera directa ADN del parásito mientras que el test ELISA lo hace de manera indirecta, detectando anticuerpos anti *N. caninum*. La utilización de alguna de las técnicas dependerá de la procedencia de la muestra a analizar y del equipamiento disponible para realizar las pruebas.

6. Conclusiones

Se reportó por primera vez la detección de ADN a través de PCR, de *N. caninum* a partir de muestras de citobrush del tracto reproductor de bovinos.

ADN de *N. caninum* se detectó en 23 de las 153 muestras analizadas de citobrush de ganado bovino de carne. La prevalencia a nivel individual fue de 15% (IC_{95%}: 10,2-21,5%).

Se caracterizó genéticamente, aunque de manera parcial, algunas de las cepas que circulan en los predios analizados a través del análisis de microsatélites. Concluyendo que la circulación de cepas de *N. caninum* en rodeos lecheros y cárnicos es similar.

Se optimizó el test ELISA *in house* desarrollado previamente en el Laboratorio Interacciones Hospedero Patógeno del IPM, modificando el método de revelado. Se estimó el punto de corte para dicho ELISA, desarrollado con proteínas recombinantes rNcSRS2 y rNcSAG1, producidas, purificadas y caracterizadas en el propio laboratorio, siendo el valor de cut off, una DO = 1,289.

La seroprevalencia del rebaño en rodeos cárnicos uruguayos fue de 77,8%. A nivel individual, fue de 28% (IC_{95%}: 17,5-41,7%) para tambos y 12,2% (IC_{95%}: 5,8-19,3%) para rodeos de bovinos cárnicos.

7. Perspectivas

El desarrollo de test diagnóstico de neosporosis tiene consecuencias directas y favorables en la producción agrícola del país, evitando pérdidas económicas asociadas al parásito, que aún no se han medido concretamente, sino estimado.

El diagnóstico de la enfermedad permite la puesta en marcha de medidas de manejo de los rodeos, controlando la diseminación de la misma. Ya sea por eliminación de ganado bovino seropositivo dentro del rodeo, evitar que las crías de vacas/vaquillonas seropositivas sean reemplazo dentro del mismo rodeo, control de perros en los rodeos y su acceso a la alimentación y fuentes de agua del ganado para evitar su contaminación con ooquistes presentes en las heces de los perros; correcta eliminación de fetos abortados, placentas y demás tejidos que puedan estar infectados para cortar el ciclo de multiplicación del parásito. Esto implica un elevado costo económico para el establecimiento y la disminución/eliminación del parásito llevaría mucho tiempo.

Por ello, es necesario continuar estudiando sobre *N. caninum* y su transmisión, colaborando en aportar información necesaria para el desarrollo de una vacuna. Se aspira a continuar con la maestría en un proyecto enfocado en el estudio del pasaje de taquizoíto a bradizoíto de *N. caninum*, buscando conocer las proteínas claves para el

proceso, que pueden ayudar en el desarrollo de test diagnósticos, de una vacuna y de control de la enfermedad.

8. Bibliografía

- Almería, S. (2013). *Neospora caninum* and Wildlife. *International Scholarly Research Notices*, 2013(1), 947347. <https://doi.org/10.5402/2013/947347>
- Alves Neto, A. F., Bandini, L. A., Nishi, S. M., Soares, R. M., Driemeier, D., Antoniassi, N. A. B., Schares, G., & Gennari, S. M. (2011). Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after exposure to different physical and chemical treatments. *The Journal of Parasitology*, 97(1), 135-139. <https://doi.org/10.1645/GE-2571.1>
- Alves Sinnott, F., da Silva Leal, K., de Oliveira Silva, M. T., Barros de Pinho, R., Pappen, F., da Rosa Farias, N. A., Bedoya Llano, H. A., Pereira Garcia Melo, D., & Borsuk, S. (2020a). An indirect ELISA for Neosporosis: Associating recombinant *Neospora caninum* proteins NcSRS2 and NcSAG1. *Veterinary Parasitology*, 281, 109101. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109101>
- Alves Sinnott, F., da Silva Leal, K., de Oliveira Silva, M. T., Barros de Pinho, R., Pappen, F., da Rosa Farias, N. A., Bedoya Llano, H. A., Pereira Garcia Melo, D., & Borsuk, S. (2020b). An indirect ELISA for Neosporosis: Associating recombinant *Neospora caninum* proteins NcSRS2 and NcSAG1. *Veterinary Parasitology*, 281, 109101. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109101>
- Anderson, M. L., Blanchard, P. C., Barr, B. C., Dubey, J. P., Hoffman, R. L., & Conrad, P. A. (1991). *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(2), 241-244.
- Bañales, P., Easton, C., Haritani, M., Kashiwazaki, Y., Paullier, C., & Pizzorno, M. (1998). Aborto bovino por *Neospora caninum* en el Uruguay: Primeros diagnósticos. *Veterinaria (Montevideo)*, 34(139-140), 28-32.
- Bañales, P., Fernandez, L., Repiso, M. V., Gil, A., Dargatz, D. A., & Osawa, T. (2006). A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 139(1-3), 15-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.004>

- Barber, J. S., Gasser, R. B., Ellis, J., Reichel, M. P., McMillan, D., & Trees, A. J. (1997a). Prevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Different Canid Populations. *The Journal of Parasitology*, 83(6), 1056-1058. <https://doi.org/10.2307/3284361>
- Barber, J. S., Gasser, R. B., Ellis, J., Reichel, M. P., McMillan, D., & Trees, A. J. (1997b). Prevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Different Canid Populations. *The Journal of Parasitology*, 83(6), 1056-1058. <https://doi.org/10.2307/3284361>
- Barber, J. S., & Trees, A. J. (1998). Naturally occurring vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 57-64. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00171-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00171-9)
- Bentancourt Rossoli, J. V., Soto Cabrera, A., Moore, D. P., Pedrana, J., Campero, L. M., Hecker, Y. P., & Scioscia, N. P. (2023). Evidencia serológica de *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en roedores silvestres y sinantrópicos de sistemas productivos bovinos lecheros del sudeste de Buenos Aires. *Parasitus*. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/252954>
- Bjerkås, I., Mohn, S. F., & Presthus, J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift Fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 70(2), 271-274. <https://doi.org/10.1007/BF00942230>
- Boysen, P., Klevar, S., Olsen, I., & Storset, A. K. (2006). The Protozoan *Neospora caninum* Directly Triggers Bovine NK Cells To Produce Gamma Interferon and To Kill Infected Fibroblasts. *Infection and Immunity*, 74(2), 953-960. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.953-960.2006>
- Briano, C., Regidor-Cerrillo, J., Easton, C., Pieruccioni, F., Romero, A., Peraza, P., Mederos, A., Dutra, F., Briano, C., Regidor-Cerrillo, J., Easton, C., Pieruccioni, F., Romero, A., Peraza, P., Mederos, A., & Dutra, F. (2021). Diagnóstico molecular de *Neospora caninum* en fetos abortados espontáneamente en bovinos de Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 57(216). <https://doi.org/10.29155/vet.57.216.3>
- Cabrera, A., Berná, L., López, L., Faral-Tello, P., Arevalo, A. P., Crispo, M., Francia, M. E., & Robello, C. (2023). New insights into phenotype and genotype relationships in *Neospora*

caninum. *Frontiers in Veterinary Science*, 10.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1214971>

- Cabrera, A., Fresia, P., Berná, L., Silveira, C., Macías-Rioseco, M., Arevalo, A. P., Crispo, M., Pritsch, O., Riet-Correa, F., Giannitti, F., Francia, M. E., & Robello, C. (2019). Isolation and molecular characterization of four novel *Neospora caninum* strains. *Parasitology Research*, 118(12), 3535-3542. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06474-9>
- Campero, C. M., Anderson, M. L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., & Poso, M. A. (1998). *Neospora caninum* -associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Veterinary Record*, 143(8), 228-229. <https://doi.org/10.1136/vr.143.8.228>
- Campero, L. M., Dellarupe, A., Rambeaud, M., & Venturini, M. C. (2023). *Neospora caninum*. En *Protozoos Parásitos de importancia sanitaria: Un abordaje transdisciplinar*. Universidad Nacional de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/154565>
- Campero, L. M., Minke, L., Moré, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, D. P., Hecker, Y., Campero, C. M., Schares, G., & Venturini, M. C. (2015). Evaluación y comparación de pruebas serológicas para la detección de la neosporosis bovina en Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 47(4), 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.07.002>
- Campero, L. M., Moreno-Gonzalo, J., Venturini, M. C., Moré, G., Dellarupe, A., Rambeaud, M., Echaide, I. E., Valentini, B., Campero, C. M., Moore, D. P., Cano, D. B., Fort, M., Mota, R. A., Serrano-Martínez, M. E., Cruz-Vázquez, C., Ortega-Mora, L. M., & Álvarez-García, G. (2018). An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 50(1), 75-84. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1401-x>
- Carrillo Parraguez, M., Ponssa, E., Caffarena, D., Artagaveytia, J., Sotelo, F., Fariña, S., Mendoza, A., & Giannitti, F. (2025). Estimation of direct economic and productive losses due to abortions caused by *Neospora caninum* in the primary dairy sector of Uruguay. *Frontiers in Veterinary Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1502742>
- Chávez-Velásquez, A., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Casas-Astos, E., Rosadio-Alcántara, R., Serrano-Martínez, E., & Ortega-Mora, L. M. (2004). *First Report*

of Neospora caninum Infection in Adult Alpacas (Vicugna pacos) and Llamas (Lama glama). <https://doi.org/10.1645/GE-260R>

Conrad, P. A., Barr, B. C., Sverlow, K. W., Anderson, M., Daft, B., Kinde, H., Dubey, J. P., Munson, L., & Ardans, A. (1993). In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. From aborted bovine fetuses. *Parasitology*, 106 (Pt 3), 239-249. <https://doi.org/10.1017/s0031182000075065>

Da Silva Silveira, C., Armendano, J. I., Moore, D. P., Cantón, G. J., Macías-Rioseco, M., Riet-Correa, F., & Giannitti, F. (2020). Comparación de ELISAs comerciales para la detección de anticuerpos en la investigación diagnóstica del aborto asociado a *Neospora caninum* en rodeos lecheros de Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.004>

Duarte, P. O., Oshiro, L. M., Zimmermann, N. P., Csordas, B. G., Dourado, D. M., Barros, J. C., & Andreotti, R. (2020). Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. *Scientific Reports*, 10, 9043. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65991-1>

Dubey, J. P. (1999). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 84(3), 349-367. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00044-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00044-8)

Dubey, J. P. (2003a). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41(1), 1-16. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>

Dubey, J. P. (2003b). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology*, 41(1), 1-16. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>

Dubey, J. P., Barr, B. C., Barta, J. R., Bjerkås, I., Björkman, C., Blagburn, B. L., Bowman, D. D., Buxton, D., Ellis, J. T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D. E., Howe, D. K., Jenkins, M. C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A. E., Mattsson, J. G., McAllister, M. M., ... Lindsay, D. S. (2002). Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 929-946. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(02\)00094-2](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(02)00094-2)

Dubey, J. P., Buxton, D., & Wouda, W. (2006). Pathogenesis of bovine neosporosis. *Journal of*

- Comparative Pathology*, 134(4), 267-289. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.11.004>
- Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Ferreira, L. R., Choudhary, S., Verma, S. K., Kwok, O. C. H., Fetterer, R., Butler, E., & Carstensen, M. (2014). Isolation of viable *Neospora caninum* from brains of wild gray wolves (*Canis lupus*). *Veterinary Parasitology*, 201(1-2), 150-153. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.032>
- Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L. R., Martins, J., Kwok, O. C. H., & Choudhary, S. (2011). Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 181(2-4), 382-387. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.018>
- Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (1990a). *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 2(3), 230-233. <https://doi.org/10.1177/104063879000200316>
- Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (1990b). Neosporosis in dogs. *Veterinary Parasitology*, 36(1), 147-151. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(90\)90103-I](https://doi.org/10.1016/0304-4017(90)90103-I)
- Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (1996a). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67(1-2), 1-59. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01035-7)
- Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (1996b). A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 67(1-2), 1-59. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(96\)01035-7](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01035-7)
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Anderson, M. L., Davis, S. W., & Shen, S. K. (1992). Induced transplacental transmission of *Neospora caninum* in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201(5), 709-713.
- Dubey, J. P., & Porterfield, M. L. (1990). *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *The Journal of Parasitology*, 76(5), 732-734.
- Dubey, J. P., & Schares, G. (2011). Neosporosis in animals—The last five years. *Veterinary Parasitology*, 180(1), 90-108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>
- Dubey, J. P., Schares, G., & Ortega-Mora, L. M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 323-367.

<https://doi.org/10.1128/CMR.00031-06>

- Echeverría, S., Carrión, F., Soñora, M., Cabrera, A., & Robello, C. (2025). Molecular characterization of *Neospora caninum* major antigens NcSAG1 and NcSRS2. *Royal Society Open Science*, 12(8), 250239. <https://doi.org/10.1098/rsos.250239>
- Fardy, J. M. (2009). Evaluation of diagnostic tests. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 473, 127-136. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-385-1_7
- Gondim, L. F. P. (2006). *Neospora caninum* in wildlife. *Trends in Parasitology*, 22(6), 247-252. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.03.008>
- Gondim, L. F. P., McAllister, M. M., Pitt, W. C., & Zemlicka, D. E. (2004). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 34(2), 159-161. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.001>
- Gondim, L. F. P., Sartor, I. F., Hasegawa, M., & Yamane, I. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 86(1), 71-75. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00129-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00129-6)
- Goodswen, S. J., Kennedy, P. J., & Ellis, J. T. (2013). A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 13, 133-150. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.012>
- Gray, M. L., Harmon, B. G., Sales, L., & Dubey, J. P. (1996). Visceral neosporosis in a 10-year-old horse. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 8(1), 130-133. <https://doi.org/10.1177/104063879600800125>
- Gui, B.-Z., Lv, Q.-Y., Ge, M., Li, R.-C., Zhu, X.-Q., & Liu, G.-H. (2020). First report of *Neospora caninum* infection in pigs in China. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(1), 29-32. <https://doi.org/10.1111/tbed.13358>
- Helmick, B., Otter, A., McGarry, J., & Buxton, D. (2002). Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*. *Research in Veterinary Science*, 73(2), 187-189. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00093-0)

- Hemphill, A., Felleisen, R., Connolly, B., Gottstein, B., Hentrich, B., & Müller, N. (1997). Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Parasitology*, 115(6), 581-590.
<https://doi.org/10.1017/S0031182097001650>
- Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B., & Hentrich, B. (1997). Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology*, 115 (Pt 4), 371-380. <https://doi.org/10.1017/s0031182097001455>
- Hemphill, A., Fuchs, N., Sonda, S., & Hehl, A. (1999). The antigenic composition of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 29(8), 1175-1188.
[https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(99\)00085-5](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(99)00085-5)
- Howe, D. K., Crawford, A. C., Lindsay, D., & Sibley, L. D. (1998). The p29 and p35 immunodominant antigens of *Neospora caninum* tachyzoites are homologous to the family of surface antigens of *Toxoplasma gondii*. *Infection and Immunity*, 66(11), 5322-5328. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.11.5322-5328.1998>
- Ibrahim, H. M., Huang, P., Salem, T. A., Talaat, R. M., Nasr, M. I., Xuan, X., & Nishikawa, Y. (2009). Short report: Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in northern Egypt. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(2), 263-267.
- Innes, E. A., Andrianarivo, A. G., Björkman, C., Williams, D. J. L., & Conrad, P. A. (2002). Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*, 18(11), 497-504. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02372-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02372-3)
- Innes, E. A., Panton, W. R., Marks, J., Trees, A. J., Holmdahl, J., & Buxton, D. (1995). Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum*, as shown by incorporation of 3H uracil. *Journal of Comparative Pathology*, 113(1), 95-100.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(05\)80075-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(05)80075-1)
- Karamati, S. A., Effatpanah, H., Khodayari, M. T., Shiee, M. R., Davari, A., Faraji, R., Angazbany, F., & Bozorgomid, A. (2025). Global Prevalence of *Neospora caninum* in Domestic Pigs (*Sus domesticus*) and Wild Boars (*Sus scrofa*): A Systematic Review and

Meta-Analysis. *Veterinary Medicine and Science*, 11(1), e70207.

<https://doi.org/10.1002/vms3.70207>

Kashiwazaki, Y., Gianneechini, R. E., Lust, M., & Gil, J. (2004). Seroepidemiology of neosporosis in dairy cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 120(1-2), 139-144.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.001>

King, J. S., Šlapeta, J., Jenkins, D. J., Al-Qassab, S. E., Ellis, J. T., & Windsor, P. A. (2010). Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 40(8), 945-950. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.008>

Lindsay, D. S., & Dubey, J. P. (2020). Neosporosis, Toxoplasmosis, and Sarcocystosis in Ruminants: An Update. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 36(1), 205-222. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.11.004>

Lista-Alves, D., Palomares-Naveda, R., Garcia, F., Obando, C., Arrieta, D., & Hoet, A. E. (2006). Serological evidence of *Neospora caninum* in dual-purpose cattle herds in Venezuela. *Veterinary Parasitology*, 136(3), 347-349.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.11.027>

Macchi, M. V., Suanes, A., Salaberry, X., Fernandez, F., Piaggio, J., & Gil, A. D. (2020). Epidemiological study of neosporosis in Uruguayan dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 179, 105022. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105022>

Macías-Rioseco, M., Silveira, C., Fraga, M., Casaux, L., Cabrera, A., Francia, M. E., Robello, C., Maya, L., Zarantonelli, L., Suanes, A., Colina, R., Buschiazzi, A., Giannitti, F., & Riet-Correa, F. (2020). Causes of abortion in dairy cows in Uruguay. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 40, 325-332. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6550>

Marsh, A. E., Barr, B. C., Madigan, J., Lakritz, J., Nordhausen, R., & Conrad, P. A. (1996). Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 209(11), 1907-1913.

McAllister, M. M. (2016a). Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 32(2), 443-463. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>

McAllister, M. M. (2016b). Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *The Veterinary Clinics*

of North America. *Food Animal Practice*, 32(2), 443-463.

<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.012>

McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A., & McGuire, A. M.

(1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 28(9), 1473-1478.

Mineo, T. W. P., Carrasco, A. O. T., Marciano, J. A., Werther, K., Pinto, A. A., & Machado, R. Z.

(2009). Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infection in birds. *Veterinary Parasitology*, 159(2), 149-153.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.024>

Moore, D. P. (2005). Neosporosis in South America. *Veterinary Parasitology*, 127(2), 87-97.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.001>

Muradian, V., Ferreira, L. R., Lopes, E. G., Esmerini, P. de O., Pena, H. F. de J., Soares, R. M.,

& Gennari, S. M. (2012). A survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection in urban rodents from Brazil. *The Journal of Parasitology*, 98(1), 128-134.

<https://doi.org/10.1645/GE-2817.1>

Nazari, N., Shojaee, S., Salimi, M., Mohebbi, M., Ahmadifard, N., Hamzavi, Y., Zarei, Z.,

Farahmand-Rad, R., Bozorgomid, A., & Heydarian, P. (2020). Serological Survey of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* Co-Infection in Rodents in Northwestern Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 15(2), 253-258.

Osawa, T., Wastling, J., Acosta, L., Ortellado, C., Ibarra, J., & Innes, E. A. (2002).

Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay.

Veterinary Parasitology, 110(1), 17-23. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00309-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00309-6)

Oshiro, L. M., Motta-Castro, A. R. C., Freitas, S. Z., Cunha, R. C., Dittrich, R. L., Meirelles, A. C.

F., & Andreotti, R. (2015). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* serodiagnosis in human immunodeficiency virus carriers. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 48(5), 568-572. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0151-2015>

Parish, S. M., Maag-Miller, L., Besser, T. E., Weidner, J. P., McElwain, T., Knowles, D. P., &

Leathers, C. W. (1987). Myelitis associated with protozoal infection in newborn calves.

Journal of the American Veterinary Medical Association, 191(12), 1599-1600.

Patitucci, A. N., Pérez, M. J., Israel, K. F., & Rozas, M. A. (2000). *Prevalence of Neospora caninum in two dairy herds of the IX Region of Chile.*

<https://agris.fao.org/search/en/providers/125266/records/67655ef1fccf879925c10194>

Pedraza-Díaz, S., Marugán-Hernández, V., Collantes-Fernández, E., Regidor-Cerrillo, J., Rojo-Montejo, S., Gómez-Bautista, M., & Ortega-Mora, L. M. (2009). Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: Application to clinical samples. *Veterinary Parasitology*, 166(1), 38-46.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.043>

Peters, M., Lütkefels, E., Heckeroth, A. R., & Schares, G. (2001). Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, 31(10), 1144-1148. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00221-1](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00221-1)

Puray Ch., N., Chávez V., A., Casas A., E., Falcón P, N., & Casas V., G. (2006). Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 17(2), 189-194.

Regidor-Cerrillo, J., Díez-Fuertes, F., García-Culebras, A., Moore, D. P., González-Warleta, M., Cuevas, C., Schares, G., Katzer, F., Pedraza-Díaz, S., Mezo, M., & Ortega-Mora, L. M. (2013). Genetic Diversity and Geographic Population Structure of Bovine *Neospora caninum* Determined by Microsatellite Genotyping Analysis. *PLOS ONE*, 8(8), e72678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072678>

Reichel, M. P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L. F. P., & Ellis, J. T. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—The billion dollar question. *International Journal for Parasitology*, 43(2), 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022>

Reichel, M. P., McAllister, M. M., Pomroy, W. E., Campero, C., Ortega-Mora, L. M., & Ellis, J. T. (2014). Control options for *Neospora caninum*—Is there anything new or are we going backwards? *Parasitology*, 141(11), 1455-1470.

<https://doi.org/10.1017/S0031182014000158>

- Ribeiro, C. M., Soares, I. R., Mendes, R. G., de Santis Bastos, P. A., Katagiri, S., Zavilenski, R. B., de Abreu, H. F. P., & Afreixo, V. (2019). Meta-analysis of the prevalence and risk factors associated with bovine neosporosis. *Tropical Animal Health and Production*, 51(7), 1783-1800. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01929-8>
- Rojas-Pirela, M., Medina, L., Rojas, M. V., Liempi, A. I., Castillo, C., Pérez-Pérez, E., Guerrero-Muñoz, J., Araneda, S., & Kemmerling, U. (2021). Congenital Transmission of Apicomplexan Parasites: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 12, 751648. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.751648>
- Ruehlmann, D., Podell, M., Oglesbee, M., & Dubey, J. P. (1995). Canine neosporosis: A case report and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 31(2), 174-183. <https://doi.org/10.5326/15473317-31-2-174>
- Runco, M., Gos, M. L., Guichón, M. L., Campero, L. M., Venturini, M. C., Runco, M., Gos, M. L., Guichón, M. L., Campero, L. M., & Venturini, M. C. (2024). Hospedadores silvestres en Argentina de los géneros *Sarcocystis*, *Toxoplasma*, *Neospora* y *Cryptosporidium*. *Analecta veterinaria*, 44, 6-6. <https://doi.org/10.24215/15142590e091>
- Sánchez-Sánchez, R., Vázquez, P., Ferre, I., & Ortega-Mora, L. M. (2018). Treatment of Toxoplasmosis and Neosporosis in Farm Ruminants: State of Knowledge and Future Trends. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(15), 1304-1323. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181002113617>
- Schares, G., Rauser, M., Zimmer, K., Peters, M., Wurm, R., Dubey, J. P., de Graaf, D. C., Edelhofer, R., Mertens, C., Hess, G., & Conraths, F. J. (1999). Serological Differences in *Neospora caninum*-Associated Epidemic and Endemic Abortions. *The Journal of Parasitology*, 85(4), 688-694. <https://doi.org/10.2307/3285744>
- Snak, A., Serighelli Junior, G., Von Tonnemann Pilati, G., Czapak Kroetz, C., Consoni, W., Cristani, J., & de Moura, A. B. (2019). Does *Neospora caninum* cause reproductive problems in pigs? *Veterinary Parasitology*, 275, 108934. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.108934>

- Sonda, S., Fuchs, N., Connolly, B., Fernandez, P., Gottstein, B., & Hemphill, A. (1998). The major 36 kDa *Neospora caninum* tachyzoite surface protein is closely related to the major *Toxoplasma gondii* surface antigen. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 97(1-2), 97-108. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(98\)00133-9](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(98)00133-9)
- Swets, J. A. (1988). Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science (New York, N.Y.)*, 240(4857), 1285-1293. <https://doi.org/10.1126/science.3287615>
- Thilsted, J. P., & Dubey, J. P. (1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 1(3), 205-209. <https://doi.org/10.1177/104063878900100301>
- Tomasina, R., González, F. C., Echeverría, S., Cabrera, A., & Robello, C. (2023). Insights into the Cell Division of *Neospora caninum*. *Microorganisms*, 12(1), 61. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12010061>
- Vonlaufen, N., Guetg, N., Naguleswaran, A., Müller, N., Björkman, C., Schares, G., von Blumroeder, D., Ellis, J., & Hemphill, A. (2004). In Vitro Induction of *Neospora caninum* Bradyzoites in Vero Cells Reveals Differential Antigen Expression, Localization, and Host-Cell Recognition of Tachyzoites and Bradyzoites. *Infection and Immunity*, 72(1), 576-583. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.576-583.2004>
- Wei, X.-Y., An, Q., Xue, N.-Y., Chen, Y., Chen, Y.-Y., Zhang, Y., Zhao, Q., & Wang, C.-R. (2022). Seroprevalence and risk factors of *Neospora caninum* infection in cattle in China from 2011 to 2020: A systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine*, 203, 105620. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105620>
- Wilkowsky, S. E., Bareiro, G. G., Mon, M. L., Moore, D. P., Caspe, G., Campero, C., Fort, M., & Romano, M. I. (2011). An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(5), 971-976. <https://doi.org/10.1177/1040638711416845>
- Woods, L. W., Anderson, M. L., Swift, P. K., & Sverlow, K. W. (1994). Systemic neosporosis in a California black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). *Journal of Veterinary*

Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc, 6(4), 508-510.

<https://doi.org/10.1177/104063879400600425>

Yamage, M., Flechtner, O., & Gottstein, B. (1996). Neospora caninum: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain «cyst» DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *The Journal of Parasitology*, 82(2), 272-279.

Yin, J., Samawi, H., & Linder, D. (2016). Improved nonparametric estimation of the optimal diagnostic cut-off point associated with the Youden index under different sampling schemes. *Biometrical Journal*, 58(4), 915-934. <https://doi.org/10.1002/bimj.201500036>

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla 6. Muestras de ADN analizadas por PCR, de citobrush de aparato reproductor de bovinos de carne.

Nº de muestra	Nº de caravana	Predio	Departamento	Resultado PCR	Cuantificación de ADN (ng/μL)
1	5868	19	Cerro Largo	Negativo	
2	4820	21 o 20	Cerro Largo o Rivera	Negativo	
3	3732	21 o 20	Cerro Largo o Rivera	Negativo	
4	5908	21 o 20	Cerro Largo o Rivera	Negativo	
5	8127	17	San José	Negativo	
6	1659	17	San José	Negativo	
7	7055	17	San José	Negativo	
8	3188	17	San José	Negativo	
9	3041	17	San José	Negativo	
10	5519	17	San José	Negativo	
11	3035	17	San José	Positivo	
12	8912	17	San José	Negativo	
13	2265	17	San José	Negativo	
14	1421	17	San José	Negativo	
15	8992	17	San José	Negativo	
16	6172	17	San José	Negativo	
17	9680	17	San José	Negativo	
18	1802	17	San José	Negativo	
19	8107	17	San José	Negativo	
20	2367	16	Florida	Negativo	
21	1539	16	Florida	Negativo	
22	6608	16	Florida	Negativo	
23	1636	16	Florida	Negativo	
24	2361	16	Florida	Negativo	
25	6824	15	Tacuarembó	Negativo	
26	7618	15	Tacuarembó	Negativo	
27	4018	15	Tacuarembó	Negativo	
28	5458	15	Tacuarembó	Negativo	
29	7739	15	Tacuarembó	Negativo	
30	1706	18	San José	Negativo	

31	1629	18	San José	Negativo	
32	1663	18	San José	Negativo	
33	7787	18	San José	Negativo	
34	8563	18	San José	Negativo	
35	8678	22	Rocha	Negativo	
36	4294	22	Rocha	Positivo	
37	7678	23	Rocha	Positivo	
38	2496	20	Rivera	Negativo	
39	3222	20	Rivera	Negativo	
40	5802	20	Rivera	Negativo	
41	9316	20	Rivera	Negativo	
42	5814	20	Rivera	Negativo	
43	4146	20	Rivera	Positivo	
44	6090	20	Rivera	Negativo	
45	748	20	Rivera	Negativo	
46	5814	20	Rivera	Negativo	
47	5836	20	Rivera	Negativo	
48	170	19	Cerro Largo	Negativo	
49	5090	19	Cerro Largo	Negativo	
50	5500	19	Cerro Largo	Negativo	
51	8830	19	Cerro Largo	Negativo	
52	3680	19	Cerro Largo	Negativo	
53	9164	19	Cerro Largo	Negativo	
54	3092	19	Cerro Largo	Negativo	
55	3236	19	Cerro Largo	Negativo	
56	9256	19	Cerro Largo	Negativo	
57	1672	21	Cerro Largo	Negativo	
58	230	21	Cerro Largo	Negativo	
59	1096	21	Cerro Largo	Negativo	
60	6002	21	Cerro Largo	Negativo	
61	8738	21	Cerro Largo	Negativo	
62	4808	21	Cerro Largo	Positivo	
63	4855	21	Cerro Largo	Negativo	
64	5384	21	Cerro Largo	Positivo	
65	8950	21	Cerro Largo	Positivo	
66	4474	21	Cerro Largo	Positivo	
67	3592	21	Cerro Largo	Negativo	
68	2494	21	Cerro Largo	Negativo	
69	4396	21	Cerro Largo	Negativo	
70	6390	21	Cerro Largo	Negativo	
71	1746	16	Florida	Negativo	367,1
72	9961	16	Florida	Negativo	
73	1585	16	Florida	Negativo	
74	6620	16	Florida	Negativo	
75	8448	17	San José	Negativo	722,2

76	1551	17	San José	Negativo	
77	6827	17	San José	Negativo	595,8
78	7983	18	San José	Negativo	
79	850	18	San José	Negativo	
80	5786	18	San José	Negativo	
81	6315	19	Cerro Largo	Positivo	392,8
82	1250	19	Cerro Largo	Negativo	
83	2982	19	Cerro Largo	Positivo	537,2
84	4280	19	Cerro Largo	Negativo	307,3
85	8456	19	Cerro Largo	Negativo	
86	6096	19	Cerro Largo	Negativo	
87	9306	19	Cerro Largo	Negativo	
88	646	19	Cerro Largo	Negativo	
89	518	21	Cerro Largo	Negativo	478,0
90	8684	21	Cerro Largo	Negativo	
91	2520	19	Cerro Largo	Negativo	
92	8104	19	Cerro Largo	Positivo	639,1
93	9278	19	Cerro Largo	Positivo	918,7
94	8482	19	Cerro Largo	Negativo	
95	9084	21	Cerro Largo	Negativo	541,9
96	5612	21	Cerro Largo	Negativo	646,0
97	4108	21	Cerro Largo	Negativo	430,9
98	1360	21	Cerro Largo	Negativo	669,0
99	8668	22	Rocha	Negativo	1072,9
100	790	22	Rocha	Negativo	282,9
101	6138	22	Rocha	Negativo	568,1
102	2208	22	Rocha	Negativo	363,2
103	929	22	Rocha	Negativo	566,1
104	384	23	Rocha	Negativo	476,4
105	5294	20	Rivera	Negativo	1029,9
106	7310	16	Florida	Negativo	509,9
107	7013	16	Florida	Negativo	609,2
108	3772	16	Florida	Negativo	207,7
109	7877	16	Florida	Negativo	384,4
110	251	16	Florida	Negativo	56,9
111	9685	16	Florida	Negativo	119,1
112	9270	16	Florida	Negativo	479,2
113	6220	16	Florida	Positivo	430,9
114	6538	16	Florida	Negativo	263,8
115	6613	16	Florida	Negativo	196,4

116	3908	16	Florida	Negativo	262,0
117	734	16	Florida	Negativo	333,8
118	5543	16	Florida	Negativo	416,3
119	1666	18	San José	Negativo	277,6
120	6665	16	Florida	Positivo	360,8
121	2566	20	Rivera	Positivo	1389,2
122	616	20	Rivera	Negativo	397,9
123	6524	20	Rivera	Negativo	225,8
124	1174	20	Rivera	Negativo	104,8
125	2312	19	Cerro Largo	Negativo	128,5
126	9472	19	Cerro Largo	Negativo	236,9
127	8508	19	Cerro Largo	Positivo	206,1
128	1136	19	Cerro Largo	Negativo	290,2
129	4432	19	Cerro Largo	Negativo	222,2
130	314	19	Cerro Largo	Negativo	264,7
131	4008	19	Cerro Largo	Negativo	179,4
132	6760	19	Cerro Largo	Negativo	494,5
133	5752	19	Cerro Largo	Positivo	520,9
134	924	19	Cerro Largo	Positivo	252,3
135	1272	19	Cerro Largo	Negativo	332,9
136	8662	19	Cerro Largo	Negativo	114,3
137	8931	19	Cerro Largo	Negativo	136,5
138	3610	19	Cerro Largo	Negativo	183,9
139	8100	19	Cerro Largo	Positivo	152,3
140	5814	19	Cerro Largo	Positivo	312,3
141	5878	19	Cerro Largo	Positivo	145,5
142	6592	19	Cerro Largo	Negativo	200,6
143	2076	19	Cerro Largo	Negativo	154,8
144	5642	19	Cerro Largo	Negativo	216,5
145	4000	19	Cerro Largo	Negativo	354,5
146	2438	21	Cerro Largo	Negativo	391,6
147	5296	21	Cerro Largo	Negativo	822,4
148	9392	21	Cerro Largo	Negativo	927,1
149	218	21	Cerro Largo	Negativo	154,1
150	5524	21	Cerro Largo	Positivo	41,2
151	240	16	Florida	Negativo	326,1
152	302	16	Florida	Negativo	251,9
153	3633	16	Florida	Positivo	55,8

ANEXO 2

Tabla 7. Muestras de suero de bovinos lecheros utilizados para la realización de ELISA *in house*.

N° de muestra	N° de identificación	Medida de abosrbancia a 450 nm			Resultado ELISA
		Réplica 1	Réplica 2	Promedio	
1	2902	2,1395	2,0875	2,1135	Positivo
2	2925	1,0975	1,0615	1,0795	Negativo
3	2983	1,1875	1,2675	1,2275	Negativo
4	4868	1,5545	1,4875	1,521	Positivo
5	4898	1,1055	1,0245	1,065	Negativo
6	4988	1,0185	0,9035	0,961	Negativo
7	5056	0,9245	0,8735	0,899	Negativo
8	16001	1,1245	1,0275	1,076	Negativo
9	16010	1,1355	0,8405	0,988	Negativo
10	16021	1,7395	1,7795	1,7595	Positivo
11	17003	2,0995	2,0855	2,0925	Positivo
12	17006	0,8605	0,8155	0,838	Negativo
13	17017	2,0925	2,0775	2,085	Positivo
14	17023	0,9055	0,9095	0,9075	Negativo
15	17025	1,1295	1,0515	1,0905	Negativo
16	17030	1,3435	1,1945	1,269	Negativo
17	17041	0,9365	0,8545	0,8955	Negativo
18	17043	1,0775	0,9995	1,0385	Negativo
19	17045	0,9345	0,9735	0,954	Negativo
20	17052	0,8255	0,6055	0,7155	Negativo
21	17053	0,3665	0,3645	0,3655	Negativo
22	17054	0,7705	0,8445	0,8075	Negativo
23	17063	1,0705	1,0115	1,041	Negativo
24	17070	1,2975	1,2925	1,295	Positivo
25	17071	1,1285	1,0985	1,1135	Negativo

26	17074	1,4005	1,3705	1,3855	Positivo
27	17078	0,7885	0,7405	0,7645	Negativo
28	17079	0,9975	0,9485	0,973	Negativo
29	17083	0,8675	0,8355	0,8515	Negativo
30	17090	1,1155	1,0805	1,098	Negativo
31	17101	0,9345	0,7555	0,845	Negativo
32	18005	0,9055	0,9855	0,9455	Negativo
33	18009	0,4895	0,5615	0,5255	Negativo
34	18010	1,1445	1,1755	1,16	Negativo
35	18015	1,8045	1,8395	1,822	Positivo
36	18016	1,2155	1,2725	1,244	Negativo
37	18023	1,7635	1,8385	1,801	Positivo
38	18024	2,2705	2,2495	2,26	Positivo
39	18027	1,5905	1,6425	1,6165	Positivo
40	18029	1,1225	1,1475	1,135	Negativo
41	18035	1,4835	1,5405	1,512	Positivo
42	18040	0,7545	0,7895	0,772	Negativo
43	18055	0,8035	0,8035	0,8035	Negativo
44	18066	0,6475	0,5155	0,5815	Negativo
45	19004	0,6925	0,6775	0,685	Negativo
46	19005	0,675	0,628	0,6515	Negativo
47	19012	0,602	0,615	0,6085	Negativo
48	19017	1,572	1,524	1,548	Positivo
49	19039	1,235	1,107	1,171	Negativo
50	19044	1,428	1,418	1,423	Positivo

ANEXO 3

Tabla 8. Detalle de las muestras analizadas mediante ELISA *in house*, de sueros provenientes de bovinos de carne. (A) corresponde a muestras de vacas/vaquillonas que sufrieron aborto, (C) corresponde a muestras de vacas/vaquillonas control.

N° de muestra	N° de identificación	Predio	Departamento	Medida Absorbancia 450 nm			Resultado ELISA	Western Blot
				Réplica 1	Réplica 2	Promedio		
1	4918 (A)	7	Soriano	2,140	2,187	2,164	Positivo	Positivo
2	4751 (A)	7	Soriano	2,019	2,072	2,046	Positivo	Positivo
3	1416 (A)	7	Soriano	1,481	1,436	1,459	Positivo	Positivo
4	4299 (A)	7	Soriano	2,376	2,243	2,310	Positivo	Positivo
5	5524 (A)	7	Soriano	1,506	1,796	1,651	Positivo	Positivo
6	2753 (A)	7	Soriano	0,543	0,433	0,488	Negativo	
7	4809	7	Soriano	0,563	0,408	0,486	Negativo	
8	6702	7	Soriano	0,845	0,704	0,775	Negativo	
9	2884	7	Soriano	0,548	0,442	0,495	Negativo	
10	5100	7	Soriano	0,332	0,325	0,329	Negativo	
11	1984	7	Soriano	0,730	0,718	0,724	Negativo	
12	1404	7	Soriano	0,530	0,521	0,526	Negativo	
13	4907	7	Soriano	2,072	2,084	2,078	Positivo	Positivo
14	4689	7	Soriano	0,551	0,625	0,588	Negativo	
15	1412	7	Soriano	0,714	0,660	0,687	Negativo	
16	4328	7	Soriano	0,778	0,758	0,768	Negativo	
17	9158	7	Soriano	0,704	0,653	0,679	Negativo	
18	6537	7	Soriano	0,862	0,800	0,831	Negativo	
19	1414	7	Soriano	0,274	0,294	0,284	Negativo	
20	344	7	Soriano	0,176	0,210	0,193	Negativo	
21	2822	7	Soriano	0,310	0,284	0,297	Negativo	
22	2964	7	Soriano	0,298	0,299	0,299	Negativo	
23	4879	7	Soriano	0,489	0,482	0,486	Negativo	
24	2855	7	Soriano	0,810	0,804	0,807	Negativo	
25	2170 (A)	9	Soriano	0,822	0,786	0,804	Negativo	
26	2226 (A)	9	Soriano	0,880	0,897	0,889	Negativo	
27	9514	9	Soriano	0,820	0,879	0,850	Negativo	
28	5984	9	Soriano	0,472	0,419	0,446	Negativo	
29	9925	9	Soriano	0,731	0,795	0,763	Negativo	
30	1496	9	Soriano	0,634	0,752	0,693	Negativo	
31	8319	9	Soriano	0,515	0,468	0,492	Negativo	
32	9849	9	Soriano	0,789	0,830	0,810	Negativo	
33	9513 (A)	9	Soriano	0,315	0,296	0,306	Negativo	
34	9510 (A)	9	Soriano	1,560	1,520	1,540	Positivo	Positivo
35	9444 (A)	9	Soriano	1,389	1,417	1,403	Positivo	Positivo

36	3795 (A)	9	Soriano	1,790	1,781	1,786	Positivo	Positivo
37	9491 (A)	9	Soriano	1,026	1,029	1,028	Negativo	
38	9425 (A)	9	Soriano	1,101	0,963	1,032	Negativo	
39	9532 (A)	9	Soriano	0,650	0,673	0,662	Negativo	
40	2869	9	Soriano	0,599	0,672	0,636	Negativo	
41	1523	9	Soriano	0,615	0,577	0,596	Negativo	
42	1424	9	Soriano	0,527	0,506	0,517	Negativo	
43	9313	9	Soriano	0,574	0,581	0,578	Negativo	
44	9441	9	Soriano	0,335	0,364	0,350	Negativo	
45	9418	9	Soriano	0,217	0,241	0,229	Negativo	
46	1503	9	Soriano	0,244	0,244	0,244	Negativo	
47	1425	9	Soriano	0,225	0,175	0,200	Negativo	
48	9572	9	Soriano	0,350	0,333	0,342	Negativo	
49	1485	9	Soriano	0,293	0,257	0,275	Negativo	
50	9561	9	Soriano	0,344	0,334	0,339	Negativo	
51	1538	9	Soriano	0,345	0,317	0,331	Negativo	
52	1405	9	Soriano	0,351	0,342	0,347	Negativo	
53	9542	9	Soriano	0,373	0,337	0,355	Negativo	
54	8219	9	Soriano	0,404	0,366	0,385	Negativo	
55	9478	9	Soriano	0,342	0,366	0,354	Negativo	
56	5750	9	Soriano	0,230	0,197	0,214	Negativo	
57	9570	9	Soriano	0,641	0,654	0,648	Negativo	
58	9485	9	Soriano	1,130	1,097	1,114	Negativo	
59	9406	9	Soriano	0,284	0,274	0,279	Negativo	
60	9500	9	Soriano	0,472	0,465	0,469	Negativo	
61	6845	9	Soriano	0,256	0,248	0,252	Negativo	
62	9410	9	Soriano	0,448	0,457	0,453	Negativo	
63	847	9	Soriano	0,246	0,218	0,232	Negativo	
64	9478	9	Soriano	0,378	0,369	0,374	Negativo	
65	360	9	Soriano	0,511	0,488	0,500	Negativo	
66	9955	9	Soriano	0,638	0,639	0,639	Negativo	
67	7161	9	Soriano	0,175	0,183	0,179	Negativo	
68	235	9	Soriano	0,524	0,538	0,531	Negativo	
69	871	9	Soriano	0,409	0,418	0,414	Negativo	
70	9408	9	Soriano	0,321	0,315	0,318	Negativo	
71	9520	9	Soriano	0,254	0,223	0,239	Negativo	
72	807 (A)	9	Soriano	1,045	1,025	1,035	Negativo	
73	2842 (A)	9	Soriano	0,359	0,346	0,353	Negativo	
74	201 (A)	9	Soriano	0,252	0,239	0,246	Negativo	
75	8937 (A)	9	Soriano	0,291	0,299	0,295	Negativo	
76	9864	14	Durazno	0,680	0,690	0,685	Negativo	
77	9865	14	Durazno	0,706	0,619	0,663	Negativo	
78	2429	14	Durazno	0,411	0,364	0,388	Negativo	
79	5689	14	Durazno	0,293	0,398	0,346	Negativo	
80	6075 (A)	14	Durazno	0,386	0,367	0,377	Negativo	
81	9814 (A)	14	Durazno	0,312	0,321	0,317	Negativo	
82	7678	14	Durazno	0,964	0,956	0,960	Negativo	
83	314	14	Durazno	0,706	0,695	0,701	Negativo	

ANEXO 4

Tabla 9. Muestras con resultado positivo de PCR para *N. caninum* utilizadas para el análisis de microsatélites.

N° de muestra	N° de identificación	Predio	Departamento	PCR MICROSATÉLITES						N° REPETICIONES							
				6A	6B	7	8	10	R. 10	6A	6B	7	10				
2025																	
1	3035	17	San José	P	P	P	P	-	x	11		9.1	5.10.8				
2	4294	22	Rocha	P	P	P	P	-	x	11							
3	7678	23	Rocha	P	-	P	P	-	x	x							
4	4146	20	Rivera	P	P	P	P	-	P	12							
5	4808	21	Cerro Largo	P	P	P	P	-	-	10							
6	5384	21	Cerro Largo	P	P	P	P	-	-	12							
7	8950	21	Cerro Largo	P	P	P	P	-	P	12							
8	4474	21	Cerro Largo	P	P	P	P	-	P	11							
9	6315	19	Cerro Largo	P	P	P	P	-	P	12	N/A	N/A	N/A				
10	2982	19	Cerro Largo	P	P	P	P	-	P	11	N/A	9.1	6.15.9				
11	8104	19	Cerro Largo	P	P	P	-	-		12							
12	9278	19	Cerro Largo	-													
13	6220	16	Florida	-													
14	6665	16	Florida	-													
15	2566	20	Rivera	-													
16	8508	19	Cerro Largo	-													
17	5752	19	Cerro Largo	-													
18	924	19	Cerro Largo	-													
19	8100	19	Cerro Largo	-													
20	5814	19	Cerro Largo	-													
21	5878	19	Cerro Largo	-													
2024																	
22	858 000051740445	14	Durazno	P	P	P	P	-		11	12	N/A					
23	858 000051740491	14	Durazno	P	P	P	P	-		12							
24	50790585 - 9613	7	Soriano	P	P	P	P	-		13							
25	50790585 - 4721	7	Soriano	P	P	P	P	-		13							
26	858 000053351659	10	Paysandú	-							12	10					
27	858 000053061510	9	Soriano	P	P	P	P	-		12							
28	858 000049729510	9	Soriano	P	P	P	P	-		12							
29	858 000048596848	10	Paysandú	P	P	P	P	-		12							
30	9907	10	Paysandú	P	P	P	-	-		12							
31	484	14	Durazno	P	P	P	P	-		11				N/A			
32	1896	8	Colonia	P	P	P	P	-		12							
33	53236692	7	Soriano	P	P	P	P	-		11				N/A			
34	858 000044113396	15	Tacuarembó	P	P	P	P	-		12				12	9.1		
35	858 000041332938	11	Lavalleja	P	P	P	P	-		12							N/A
36	858 000046017919	7	Soriano	P	P	P	P	-		13							N/A
37	858 000047010155	10	Paysandú	P	P	P	P	-		12	N/A						
38	858 000047813931	15	Tacuarembó	-													
39	858 000047620778	12	Lavalleja	-							12						
40	858 000045519914	12	Lavalleja	-													
41	858 000048455763	12	Lavalleja	-													
42	7416	14	Durazno	-													
43	1430	9	Soriano	P	P	P	P	-		12				N/A			
44	7382	15	Tacuarembó	P	P	P	P	-	-	12				N/A			
45	7267	12	Lavalleja	P	P	P	P	-	-	12				N/A			
46	A9456	10	Paysandú	P	P	P	P	-	-	11				12			
47	9440	9	Soriano	P	P	P	P	-	-	11				12			
48	9424	9	Soriano	P	P	P	P	-	-	12				N/A			
49	5128	13	Lavalleja	P	P	P	P	-	P	12				12	N/A		
50	8407	14	Durazno	P	-	P	P	-		10							
* doble banda, no se mandó a secuenciar																	