

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



ESTUDIO SEROLÓGICO RETROSPECTIVO DE *Neospora caninum*
EN BOVINOS HOLSTEIN DE LA COMARCA LAGUNERA

POR:

RICARDO TORRESCANO LEÓN

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

SEPTIEMBRE DEL 2004.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA
DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



ESTUDIO SEROLÓGICO RETROSPECTIVO DE *Neospora caninum*
EN BOVINOS HOLSTEIN DE LA COMARCA LAGUNERA

TESIS

POR:

RICARDO TORRESCANO LEÓN

ASESOR PRINCIPAL

M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

TESIS

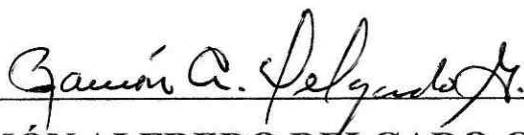
PRESENTÓ

RICARDO TORRESCANO LEÓN

SOMETIDA A CONSIDERACIÓN DE H. JURADO EXAMINADOR
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR:



**M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ
PRESIDENTE DEL JURADO**



**M.V.Z. ERNESTO MARTÍNEZ ARANDA
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL**

Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

UAAAN - UL

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”
UNIDAD LAGUNA**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

PRESIDENTE DEL JURADO:



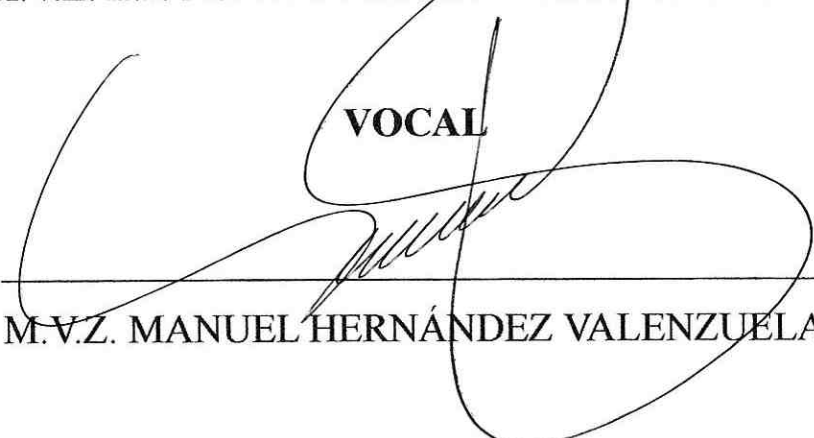
M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZALEZ

VOCAL




M.V.Z. E.P. Ma. HORTENSIA CEPEDA ELIZALDE

VOCAL



M.V.Z. MANUEL HERNÁNDEZ VALENZUELA

VOCAL SUPLENTE



M.V.Z. MA. GUADALUPE DE LA FUENTE SALCIDO

DEDICATORIAS

A mis padres el Sr. Pedro Torrescano Flores y la Sra. Lucina León de Torrescano por darme la vida y la oportunidad de ser lo que ahora soy. Gracias por todo su apoyo incondicional durante estos cinco años.

A mis hermanos Iván, Hortencia y Miguel por todo el amor y apoyo inigualable que me brindaron todo el transcurso de mi carrera profesional.

A la Srita. Lucia Aguilar Segura por su confianza y a su apreciable familia muchas gracias.

INDICE

	Página
Dedicatorias	i
Agradecimientos	ii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
2.1 Historia	3
2.2 Etiología	5
2.3 Transmisión	6
2.4 Ciclo biológico	8
2.5 Signos	8
2.6 Lesiones	12
2.7 Métodos de diagnóstico	13
2.7.1 Diagnóstico de laboratorio	14
2.7.2 Diagnóstico histológico e inmunohistoquímico	14
2.7.3 Diagnóstico serológico	15
2.7.4 Diagnóstico de ELISA	16
2.8 Control	21
2.8.1 Control de la transmisión vertical	22
2.8.2 Control de la transmisión horizontal	23
2.9 Tratamiento	24
2.10 Vacunación	24
III. Justificación	25
IV. Objetivos	26

V.	Material y métodos	26
VI.	Resultados	26
VII.	Discusión	29
VII.	Literatura citada	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Momento y frecuencia del aborto de acuerdo a la etiología	9
Tabla 2.	Reactivos	18
Tabla 3.	Diluciones para el conjugado	21
Tabla 4.	Comportamiento serológico de <i>Neospora caninum</i> en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera	28

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo biológico	8
Figura 2.	Feto abortado	10
Figura 3.	Feto momificado	10
Figura 4.	Becerro vivo infectado congénitamente	11

INDICE DE GRAFICAS

Grafica 1.	Porcentajes de prevalencia de <i>Neospora caninum</i> en algunos países comparados con la Comarca Lagunera	31
------------	--	----

ESTUDIO SEROLÓGICO RETROSPECTIVO DE NEOSPORA CANINUM EN BOVINOS HOLSTEIN DE LA COMARCA LAGUNERA.

I.- Introducción

El desarrollo y mantenimiento de una industria ganadera se basa en una eficiente reproducción. Los problemas de etiología infecciosa o no infecciosa que interrumpen la preñez resultan en grandes pérdidas económicas por lo que, es fundamental la identificación de las causas que ocasionan las fallas reproductivas que permitan un efectivo control.

Sin embargo, a pesar del actual desarrollo de las ciencias veterinarias dichos problemas persisten constituyendo un serio factor limitante del desarrollo del ganadero (Rivera y Benito, 1999).

Una gran parte de los abortos en los animales, son debidos a infecciones que llegan al feto por la circulación sanguínea materna, traspasando la barrera placentaria o atravesando directamente la placenta.

El diagnóstico de la causa del aborto es sumamente difícil ya que este solo se logra en un 25 % de los casos, y por lo tanto, la primera instancia es investigar la causa primaria del problema para tomar medidas preventivas en cada caso (Delgado, 1995).

La neosporosis de los bovinos es una enfermedad infecciosa causada por el parásito intracelular *Neospora caninum*, es reconocida entre las causas importantes de aborto en bovinos de países de todos los continentes (Echaide y Valentín, 1997; Meléndez,

1999; Anderson *et al.*, 1991; Dubey Lindsay, 1996).

Neospora caninum es un coccidio que afecta principalmente caninos y bovinos (Barr *et al.*, 1995; Lindsay *et al.*, 1996).

La enfermedad fue inicialmente descrita en caninos y posteriormente se postuló como causa de aborto epidémico en bovinos lecheros a finales de los años 80's en Nuevo México. No obstante, solo en 1989 se reconoció la enfermedad en los bovinos y su diseminación mundial (Barr *et al.*, 1995; Lindsay *et al.*, 1996).

Por lo tanto se le atribuye una distribución mundial, aunque hasta ahora ha sido diagnosticada en América del norte, Canadá, México, Australia, Nueva Zelanda, Japón y África del sur. En Europa se ha diagnosticado en Noruega, Suecia, Dinamarca, Holanda, Suiza, Francia, Irlanda y Reino Unido (Cordero *et al.*, 1999 y Delgado 1996).

La neosporosis bovina se caracteriza por ser típicamente asintomática y de transmisión congénita por lo que las hembras infectadas perpetúan el parasitismo de generación en generación, en las explotaciones ganaderas. En los casos en donde se presenta sintomatología clínica la principal manifestación es el aborto con las consecuentes pérdidas económicas que están relacionadas con la reducción en la producción de leche, disminución de la fertilidad, pérdida total de la capacidad reproductora, debida a la repetición de los abortos, también con el incremento de la mortalidad perinatal, la muerte de neonatos y la pérdida de animales adultos (Barr *et al.*, 1995; Lindsay *et al.*, 1996; Dubey, 1999a).

II.- Antecedentes

2.1 Historia

Esta enfermedad se perfila como una de las enfermedades reproductivas más importantes de los hatos tanto en ganado de carne como lechero (De Luca, 2001).

La historia de *Neosporosis* se inicia en 1984 con un reporte de Bjerkas en Noruega de un caso de encefalitis y miocarditis en caninos, producido por un protozoario (Zambrano *et al.*, 2001; Davison *et al.*, 1999; Dubey, 1999b; Bjerkas *et al.*, 1984).

En 1988, en EEUU, se aisló un parásito de características similares en 10 perros que sufrían alteraciones neurológicas, demostrándose, con el uso de técnicas serológicas e inmunohistoquímicas, que se trataba de un parásito diferente a *Toxoplasma gondii* y que fue denominado *Neospora caninum* (Cebrian *et al.*, 2000).

En 1989 Thilsted y Dubey, asociaron *Neospora* con un brote de abortos en ganado vacuno de Nuevo México. Desde entonces, ha sido descrita en países de los cinco continentes. Se ha demostrado que infecta de forma natural otras especies animales como ovejas, cabras, búfalos de agua, caballos, ciervos, camellos, coyotes, zorros y dingos (Cebrián *et al.*, 2000 y Dubey, 1999b).

A partir del año 1991 la neosporosis es reconocida entre las causas más importantes de aborto en bovinos en distintos países (Echaide y Valentín, 1997).

al., 2000 y Rojas, 2003).

Determinadas evidencias, como que una cepa aislada del perro es capaz de reproducir la enfermedad experimentalmente en las vacas o que los taquizoitos, bradizoitos y quistes de procedencia canina tienen las mismas características morfológicas que los hallados en el ganado vacuno e incluso que ambos aislados tienen comportamientos antigénicos prácticamente idénticos, hacen pensar que se trata de una única especie (Cordero *et al.*, 1999).

Una multiplicación asexual del parásito toma lugar en un amplio rango de huéspedes intermediarios, incluyendo vacas y otros animales de granja. Dos estados asexuales se distinguen: taquizoitos y bradizoitos (De Luca, 2001).

Los taquizoitos penetran activamente en las células huéspedes y se dividen rápidamente. Los taquizoitos pueden infectar y destruir diferentes tipos celulares y pueden ser transmitidos transplacentariamente hacia el feto en las vacas preñadas (De Luca, 2001).

Los taquizoitos miden de 3 a 7 μm , son de forma ovoide semilunar o globosa. Bajo la influencia de una respuesta inmune del huésped, los taquizoitos se transforman en bradizoitos (De Luca, 2001; Cordero *et al.*, 1999; Cebrián *et al.*, 2000; Dubey, 1999a; Pereira *et al.*, 1993).

Los bradizoitos se dividen muy lentamente y permanecen en estado latente y son enquistados dentro del tejido. Los tejidos con bradizoitos enquistados solo se han encontrado en el tejido neuronal (De Luca, 2001).

Los bradizoitos miden de 100 μm y 4 μm de espesor, tienen forma redondeada u

ovalada. Una disminución de la respuesta inmune del huésped puede causar una reactivación de los bradizoitos enquistados seguido por la ruptura del quiste y un recrudecimiento de la infección (De Luca, 2001 y Dubey, 1999a).

Un desarrollo sexual exclusivo toma lugar en los carnívoros el cual es el huésped definitivo. El desarrollo sexual resulta en la producción de ooquistes infecciosos que son excretados con las heces. Miden de 10 a 11 μm , son de forma subesférica que contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos. Ha sido demostrado recientemente que el perro actúa como huésped definitivo (Cebrian *et al.*, 2000; De Luca, 2001; Lindsay *et al.*, 1996; Dubey, 1999a y Greene, 1999).

2.3 Transmisión

La ruta de transmisión mejor descrita e identificada hasta el momento es la vía transplacentaria, la cual parece ser la forma mas importante para mantener la infección en los hatos, debido a la eliminación del parásito a través de los fetos abortados o por el nacimiento de terneros congénitamente infectados (Zambrano *et al.*, 2001; Dubey, 1999a; Williams *et al.*, 2000).

Se piensa que la infección en bovinos se iniciaría como consecuencia de la ingestión de alimentos y agua contaminados por esos ooquistes. En el intestino del bovino los parásitos abandonarían los ooquistes y se diseminarian para invadir y multiplicarse en células del cerebro, médula, nervios periféricos y retina, tejidos en los que finalmente forman quistes.

En vacas gestantes el parásito se localiza en útero y la placenta e infecta al feto (transmisión vertical) (Echaide *et al.*, 2000a).

Aparentemente el parásito se reactiva con la preñez de las vacas y entonces ocurre la transmisión transplacentaria, pudiendo existir tres posibles resultados:

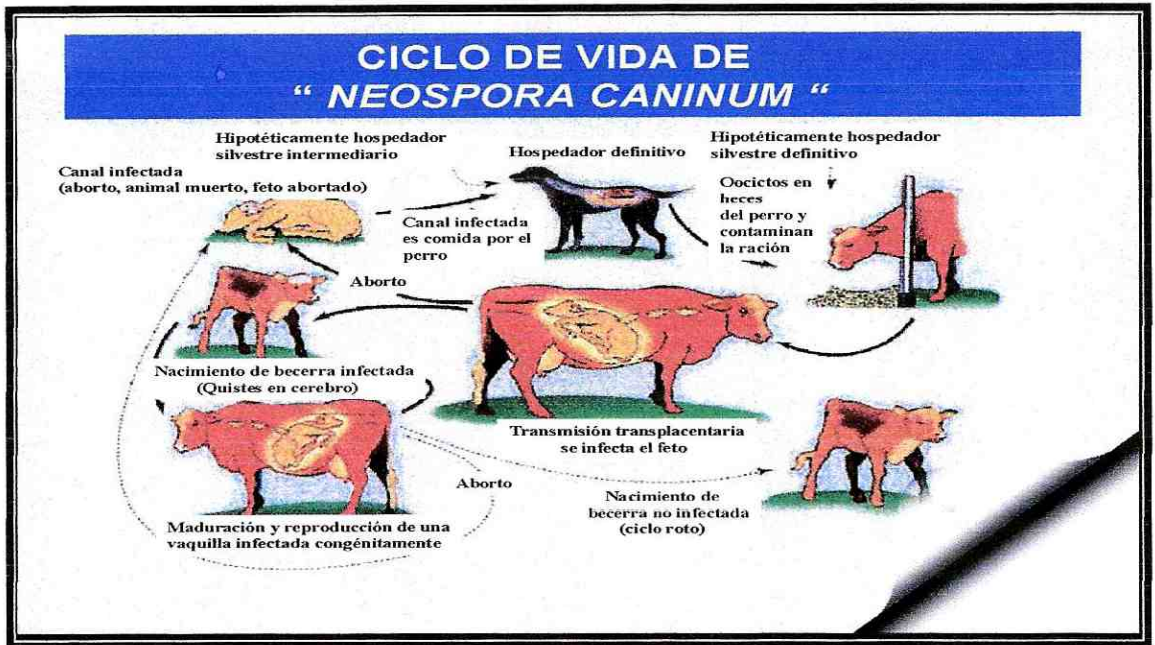
- La producción de un aborto o de un mortinato.
- El nacimiento de un ternero aparentemente sano pero con infección persistente.
- El nacimiento de un ternero sano sin la infección, en cuyo caso el ciclo se rompe (Benavides, 1992; Williams *et al*).

El perro se infecta cuando ingiere los fetos, placentas u órganos de bovinos y de otras especies infectados con *N. caninum*. Hoy se conoce que el perro es el huésped definitivo. Una vez que la enfermedad se ha instalado en un hato puede persistir sin la presencia de los perros a través de la transmisión vertical (Echaide y Valentín., 2000b; Benavides, 1992).

Experimentalmente se ha demostrado la transmisión vertical vía calostrado de la enfermedad (Cebrian *et al.*, 2000).

2.4 Ciclo biológico

Figura 1. Ciclo biológico de *Neospora caninum*



(Forsythe, 2000).

2.5 Signos

El aborto es definido como la pérdida del producto de la concepción a partir del periodo fetal (aprox. 42 días) hasta antes de los 260 días en el caso del bovino. Los agentes infecciosos pueden afectar el embrión o el feto en cualquier etapa de su desarrollo ocasionando la muerte (con o sin expulsión), malformaciones congénitas, nacidos muertos, nacimiento de crías débiles o nacimiento de crías persistentemente infectadas (Rivera y Benito, 1999).

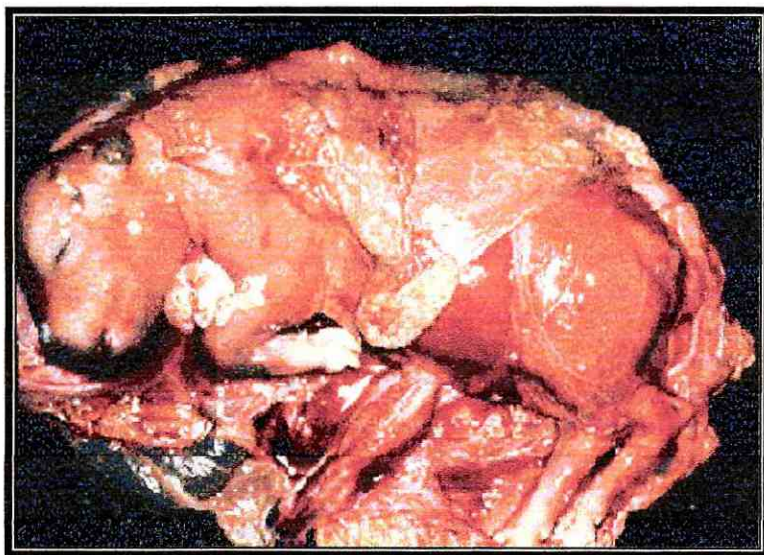
La *Neosporosis* genera problemas en el ganado tales como muerte fetal temprana, momificación y aborto (De Luca, 2001; Rivera *et al.*, 1998).

El aborto es el único signo clínico observado en las vacas infectadas. Los fetos abortados están normalmente autolisados o momificados. La edad del aborto oscila entre los 3 y los 8 meses aunque en su mayoría abortan entre los 4 y 6 meses de gestación (Echaide y Valentín., 2000b ; Calzada *et al.*, 2001; Zambrano *et al.*, 2001; Oviedo, 2003; Bryan *et al.*, 1994; Ortega y Pereira., 2001; Dubey, 1999a; Barr *et al.*, 1994; Otter *et al.*, 1997; Forsythe, 2000).

Tabla 1. Momento y frecuencia del aborto de acuerdo a la etiología (De Luca, L. 2003).

	TIEMPO DEL ABORTO	FRECUENCIA	
		COMÚN	RARA
Herpes virus bovino HVB-1	5-9 meses	X	
Virus de la diarrea viral bovina	1-9 meses	X	
Brucella abortus	5-9 meses	X	
Campylobacter fetus	4-6 meses	X	
Leptospira sp	7-9 meses	X	
NEOSPORA CANINUM	4-7 MESES	X	
ureoplasma	7-9 meses	X	
Hongos	6-9 meses	X	
Actinomicces pyogenes	3-9 meses		X
Chlamidia sp	6-9 meses		X
Listeria monocytogenes	5-9 meses		X

Figura 2. Feto abortado



La *Neosporosis* se caracteriza por el aborto entre el cuarto y el séptimo mes de gestación (Gómez, 1998).

Figura 3. Feto momificado



Aborto de una vaca serológicamente positiva a *Neospora caninum* (Rivera y Benito., 1999).

Pueden ocurrir muchos abortos en un periodo relativamente corto y las hembras bovinas que han abortado a causa de *Neospora caninum* pueden gestar un ternero infectado de forma congénita en el siguiente parto o volver abortar (Bryan *et al.*, 1994; Otter *et al.*, 1997).

Los terneros que nacen infectados de forma congénita pueden presentar sintomatología neuromuscular. Los signos clínicos aparecen 5 días después del nacimiento ó a las dos semanas, con terneros que puedan nacer bajos de peso, débiles e incapaces de ponerse de pie (Bryan *et al.*, 1994; Otter *et al.*, 1997; Dubey, 1999a; Barr *et al.*, 1994).

Figura 4. Becerro vivo infectado congénitamente



La enfermedad no sólo genera abortos. También puede provocar asimetría ocular o parálisis progresiva en los terneros (Echaide Valentín., 2000a).

La temperatura, la frecuencia cardíaca y respiratoria son normales. Los miembros anteriores y posteriores de algunos terneros pueden permanecer en extensión rígida. El examen neurológico revela ataxia, reflejos patelares disminuidos y pérdida de la proporción de los miembros pélvicos (Bryan *et al.*, 1994; Otter *et al.*, 1997; Conigliaro, 1997; Meléndez, 1999 y Dubey, 1999a).

En los bovinos de leche se ha reportado una mayor prevalencia, no porque haya una mayor resistencia en los bovinos de carne, sino porque se manejan mayores densidades de población lo que favorece a la diseminación de la enfermedad (Zambrano *et al.*, 2001).

2.6 Lesiones

Neospora caninum parasita principalmente células del Sistema Nervioso Central, músculo esquelético y cardíaco, células endoteliales y placenta (Cebrian *et al.*, 2000; Calzada *et al.*, 2001; Corvin y Nahm, 1997).

La multiplicación del parásito por división intracelular destruye células parasitadas y produce focos de necrosis rodeados de áreas de inflamación no supurativa (Cebrián *et al.*, 2000 y Rojas, 2003).

Los focos necróticos localizados en músculo y tejido nervioso son los responsables de la aparición de alteraciones neuromusculares, mientras que la placentitis, los focos necróticos en los cotiledones y las lesiones necróticas e inflamatorias en el sistema nervioso central y corazón de los fetos son los causantes del aborto (Cebrián *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 1998).

Los fetos no presentan alteraciones macroscópicas aparentes, aunque suele haber un grado elevado de autólisis (Cebrián *et al.*, 2000; Zambrano *et al.*, 2001; Dubey, 1999a).

Podemos encontrar terneros vivos afectados congénitamente y con sintomatología muy variable, las lesiones en el Sistema Nervioso Central pueden producir cuadros clínicos que a menudo se limitan a disfunciones de las extremidades, que van desde ataxia, los miembros pueden estar flexionados o hiperextendidos, disminución del reflejo patelar hasta parálisis total (Cebrián *et al.*, 2000; Echaide y Valentín., 2000a).

También podemos observar exoftalmos y posición asimétrica de los ojos (Cebrián *et al.*, 2000 y Echaide y Valentín., 2000a).

2.7 Métodos de diagnóstico

El diagnóstico en casos de abortos por *Neospora* incluye examen del feto, serología fetal y serología materna (De Luca, 2001).

Es importante que los fetos abortados sean examinados mediante una necropsia y análisis microscópicos adecuados, previa recolección y envío de fetos junto a la placenta, a los centros de diagnóstico (De Luca, 2001).

Considerando que *Neosporosis* puede producir aborto, su diagnóstico se debe orientar hacia la diferenciación con problemas de tipo bacterianos, virales y protozoarios, que cursan con sintomatología similar.

Especial énfasis en el diagnóstico diferencial, debe hacerse con el *Toxoplasma gondii* considerando las similitudes taxonómicas, morfológicas y epidemiológicas con *Neospora*. Así mismo, se debe considerar el *Sarcocystis* sp, el cual produce lesiones histológicas similares (Zambrano *et al.*, 2001).

El diagnóstico de la infección por *Neospora* en las vacas, se basa en el análisis del suero sanguíneo para detectar la presencia de anticuerpos específicos (Echaide y Valentín., 2000a).

2.7.1 Diagnóstico de laboratorio

Cuando exista sospecha de abortos por *Neospora* las muestras enviadas al laboratorio de diagnóstico deberán ser las siguientes:

- Suero de la madre.
- Suero o exudados torácicos del feto.
- Feto entero con su placenta, o en su lugar, muestras de cerebro, médula (a nivel del cuello), corazón, hígado, músculo esquelético y placenta, fijados en formol al 10%, si no se dispone de formol también se puede fijar las muestras en alcohol para su estudio histológico (Conigliaro, 1997; Cebrian *et al.*, 2000).

2.7.2 Diagnóstico histológico e inmunohistoquímico

Para confirmar el diagnóstico histológico se emplean técnicas de inmunohistoquímica que nos permiten evidenciar la presencia de taquizoitos entre los focos de microgliosis o en el infiltrado inflamatorio que rodea al foco necrótico (Morales *et al.*, 1997; Gómez, 1998 y Cebrian *et al.*, 2000).

También nos facilita la observación de quistes tisulares, siendo estos mas frecuentes en fetos abortados al final de la gestación, una vez que se ha desarrollado el sistema inmunitario del feto. Esta técnica tiene una gran especificidad pero baja sensibilidad debido a la escasa presencia del parásito en las lesiones (Cebrian *et al.*, 2000).

2.7.3 Diagnóstico serológico

Para el diagnóstico serológico de *Neospora* podemos emplear técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA (Rojas, 2003; Benavides, 1992; Gómez, 1998; Cebrián *et al.*, 2000 y Dubey, 1999b).

Estos métodos nos van a servir para detectar anticuerpos en vacas adultas, animales recién nacidos y fetos abortados (Cebrián *et al.*, 2000).

El hallazgo de anticuerpos específicos frente a *Neospora* en líquidos fetales nos confirma la infección del feto. Se debería estudiar tanto las IgM como las IgG debido a que las IgM son las primeras en elevarse, aunque van desapareciendo gradualmente, mientras que las IgG aparecen mas tardíamente pero permanecen en el tiempo, en infecciones agudas es posible encontrar solo elevadas las IgM. En IFI se consideran positivos títulos de 1/50 para fetos abortados y 1/25 para sueros o líquidos fetales (Cebrián *et al.*, 2000 y Dubey, 1999a).

Los títulos de anticuerpos en vacas infectadas suelen aumentar en el periodo alrededor del parto o del aborto. Se consideran positivos los títulos superiores a 1/640 en IFI. La serología positiva en vacas abortadas no es suficiente para diagnosticar la causa del aborto, pero añadido a las pruebas histológicas, la serología

fetal o la presentación clínica de los abortos pueden ayudar a confirmar la enfermedad (Cebrián *et al.*, 2000; Barr *et al.*, 1995 y Otter *et al.*, 1997).

Técnica de análisis inmuno absorbente ligado a enzimas para la detección de anticuerpos en suero bovino.

El paquete de ELISA* para la detección de *Neospora caninum* es usado para la detección de anticuerpos contra este protozooario en suero bovino.

Resumen

Neospora caninum es un protozooario recientemente descubierto, reconocido en el mundo como un agente abortivo importante de los bovinos. La identificación de las vacas infectadas con *Neospora caninum* es esencial porque estas vacas infectadas tienen un riesgo 2-3 veces mayor de presentar aborto, comparadas con las vacas no infectadas. Mas aun, las vacas que no abortan originan becerros infectados congénitamente, 9 de 10 veces. La serología puede utilizarse para detectar anticuerpos e identificar al ganado infectado con *Neospora caninum*. Este paquete de ELISA* para el diagnóstico de *Neospora caninum* tiene alta sensibilidad (>99%) y alta especificidad (98.4%) en la detección de anticuerpos en suero bovino.

*BIOVET

Principios del ensayo.

El paquete de diagnóstico es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) diseñado para detectar la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en suero bovino. El suero es diluido 1:200 e incubado por 45 minutos en micropozos sensibilizados con

antígeno de *Neospora caninum* (aislamiento NC1). Después del primer lavado, se agrega a los pozos un conjugado anti IgG bovina y se incuba por otros 30 minutos. Después del segundo lavado, se agrega sustrato en cada pozo y las placas se leen por espectrofotometría después de 15 minutos. El desarrollo de un color verde indica la presencia de anticuerpos específicos contra *Neospora caninum*. A mayor concentración de anticuerpos en el suero, habrá mayor intensidad del color verde y mayor densidad óptica.

Material y métodos.

Agua destilada.

Pipeta sencilla y multicanal ajustables.

Puntas desechables para pipeta.

Lavador de microplacas ELISA, manual.

Lector de placas ELISA de 96 pozos, equipado con filtro de 405 nm.

Tubos para dilución de las muestras.

- La solución amortiguadora se reconstituye una tableta en un litro de agua destilada y se guarda a 4°C (hasta una semana).

Tabla 2. Reactivos

REACTIVO	PRESENTACION
Microplacas absorbidas con antígeno de <i>Neospora caninum</i> (NC1)	2 PLACAS
Conjugado de anti IgG bovina	125 µl
Tabletas de sol. Amortiguadora	2 *
Substrato	25 ml.
Control positivo (1/100)	1.5 ml.
Control negativo (1/100)	1.5 ml.
Sellos de placa	4

Precauciones.

- Exclusivo para uso veterinario *in vitro*.
- El material debe eliminarse como si fuera infeccioso.

Procedimiento de la prueba.

1.-Los reactivos se ponen a temperatura ambiente, microplacas, substrato y la solución amortiguadora.

2.-Se prepara la dilución del suero en tubos, con la solución amortiguadora 5 µl en 495 µl de solución amortiguadora (1/100). No se diluyen los controles positivo y negativo.

3.-La prueba se hace por duplicado. Se agregan 50 μ l de solución amortiguadora a cada pozo y 50 μ l de solución amortiguadora para los blancos, 50 μ l del control positivo, 50 μ l del control negativo y 50 μ l de cada muestra, como se indica:

Blancos:	A1 y A2
Control negativo:	B 1 y B2
Control positivo:	C 1 y C 2
Muestra 1:	D1 y D 2
Muestra 2:	E 1 y E 2

4.-Se sella la placa e incuba por 45 minutos a 37°C.

5.-Se lava 3 veces con la solución amortiguadora y se golpea la placa sobre una toalla absorbente para eliminar residuos líquidos.

6.-Se diluye el conjugado en solución amortiguadora (ver el apéndice). Cuando se pipetea, se enjuaga el interior de la punta de pipeta 4-5 veces, con solución amortiguadora.

7.-Se agregan 100 μ l de conjugado diluído en cada pozo.

8.-Se sella la placa e incuba por 30 minutos a 37°C.

9.-Se repite el paso 5.

10.-Se agregan 100 μ l de solución de sustrato, debe estar a temperatura ambiente.

11.-Se protege la placa de los rayos luminosos. Se agita suavemente al final de 15 minutos de reacción a temperatura ambiente.

12.-Se lee con el espectrofotómetro; con un lector ELISA a longitudes de onda de 405 y 490 nm (si solo se dispone de una longitud de onda, se usa la de 405 nm, asegurándose de limpiar el fondo de la placa antes de hacer la lectura). Se elimina el valor de los blancos. Si la densidad óptica (DO) del control positivo no ha alcanzado 0.45, Se lee nuevamente la palca cada 3 minutos hasta que se alcance el nivel de 0.45.

Calculo de los resultados

Suero control positivo:

Se anota el valor medio de DO de los pozos control positivo (C1 y C2) y resta el valor medio de los blancos (A1, A2): DO+

Suero control negativo:

Se anota el valor medio de DO de los pozos control negativo (B1 y B2) y resta el valor medio de los blancos (A1, A2): DO –

Muestras

Para cada muestra, Se anota el valor medio de DO (D1, D2...): D_{om}

Para cada muestra, el resultado es interpretado como un índice del suero control positivo: D_{Om}/DO+

Control de calidad

La DO+ debe estar arriba de 0.45.

Para que la prueba sea valida, el índice DO–/DO+ debe ser <0.30

Interpretación de los resultados

Un resultado (DOM/DO+) mayor o igual a 0.60 se considera positivo. Un resultado inferior a 0.60 se considera negativo con una sensibilidad de >99% y una especificidad de 98.4%.

Apéndice

Tabla 3. Diluciones para el conjugado.

TIRAS	CONJUGADO (µl)	BUFFER (µl)
1	6	1869
2	12	3738
3	18	5607
4	22	6853
5	28	8722
1 Placa	34	10591

(Anderson *et al.*, 1991; Dubey *et al.*, 1988; Dubey *et al.*, 1988; Pare *et al.*, 1995; Pare *et al.*, 1996; Pare *et al.*, 1997).

2.8 Control

Hasta no conocer exactamente el reservorio del parásito no es posible tomar medidas de control y prevención; probablemente los ooquistes en las heces del hospedador definitivo son la fuente de infección y por ello los alimentos y el agua deben

protegerse de los animales domésticos y salvajes, limitando su contaminación y los fetos abortados deben incinerarse o manejarse en forma que no queden al alcance de los hospedadores definitivos (Lindsay *et al.*, 1996).

La eliminación del parásito en el bovino infectado a través de la quimioterapia o de la propia respuesta inmune postinfección, se dificulta por la habilidad que tiene *N. caninum* para formar quistes en el tejido nervioso, lo cual le da protección y le permite persistir por tiempo indefinido (Echaide y Valentín., 2000a).

El control se basa en evitar la transmisión y eliminar a los animales infectados (Cebrián *et al.*, 2000).

Hay que tomar las siguientes medidas:

- Eliminación gradual de animales seropositivos, comenzar por las vacas que hayan abortado anteriormente.
- Las vacas seropositivas que no puedan ser eliminadas deberían ser inseminadas con razas de aptitud cárnica.
- Diagnosticar correctamente los abortos, pues podemos tener explotaciones con alta seroprevalencia y alto número de abortos en los que *Neospora* coexista con otros patógenos que puedan ser causantes de los mismos (Cebrián *et al.*, 2000 y Rojas, 2003).

2.8.1 Control de la transmisión vertical.

Las hembras infectadas van a dar terneros infectados, la eliminación de estos animales sería lo mas recomendable.

La infección congénita también puede ser reducida permitiendo solo la entrada a la

explotación de animales de reposición seronegativos (Thurmond y Hietala, 1995).

Además de:

- Controlar serológicamente las hembras de reposición, tanto las nacidas en la ganadería como las adquiridas a otros ganaderos.
- Dejar como reposición solo descendencia de vacas seronegativas.
- Si se utiliza trasplante de embriones comprobar que las receptoras sean seronegativas (Cebrián *et al.*, 2000 y Rojas, 2003).

2.8.2 Control de la transmisión horizontal.

Se trata de evitar la exposición de los animales a tejidos o fluidos infectados con *Neospora caninum* provenientes de vacas infectadas que tienen un parto o abortan.

Por todo ello estrictas medidas de higiene en la explotación (especialmente en la época de partos) y el uso de parideros individuales serían altamente recomendables (Thurmond y Hietala, 1995).

Además de:

- Evitar el acceso a perros y otros carnívoros a los recintos del ganado, especialmente a los almacenes de alimentos, para evitar la contaminación fecal (Cebrian *et al.*, 2000 y Rojas, 2003).
- Eliminación rápida de placentas, fetos abortados y animales muertos para evitar su ingestión por los carnívoros (Cebrian *et al.*, 2000; Rojas, 2003 y Dubey, 1999a).
- Desinfección de los materiales contaminados por el aborto (Cebrian *et al.*, 2000;

Rojas, 2003).

2.9 Tratamiento

Los quimioterapéuticos, que son efectivos o parcialmente efectivos para el tratamiento en la especie canina, no serían útiles para bovinos con quistes y agregarían el riesgo de contaminar la leche con residuos químicos. Sin embargo, esto no impide que se este investigando la utilidad de nuevos productos químicos (Echaide y Valentín., 2000b).

Se puede considerar el tratamiento de las vaquillas preñadas para prevenir el aborto y la transmisión vertical de la infección. Ha sido reportado que el tratamiento con monensina (40-120 mg./vaca/día) no es absolutamente protector de los abortos de las vaquillas durante la primera preñez, pero es una profilaxis a tener en cuenta (De Luca, 2001).

La clindamicina a razón de (10-40 mg./kgpv/oral/30 días consecutivos/dos o tres dosis).

Este fármaco parece ser eficaz frente a los taquizoitos, pero no destruye los quistes (Cordero *et al.*, 1999).

2.10 Vacunación

El uso de vacunas permitiría disminuir la ocurrencia de abortos, aunque difícilmente logren eliminar las infecciones persistentes a causa de los quistes mencionados (Echaide y Valentín., 2000a).

Hay una vacuna de protozoario muerto en el mercado, a nivel mundial que está dando buenos resultados (Choromanski, 1996; Choromanski, 1996a); con las

siguientes características y ventajas.

- Primera vacuna disponible para Neosporosis.
- Seguridad de una vacuna muerta.
- Seguridad en vacas gestantes.

La dosis es, durante el primer trimestre de gestación administrar 5 ml. por vía subcutánea.

Seguido de una segunda dosis de 5ml. Por vía subcutánea 3 a 4 semanas después (Choromanski, 1996; Choromanski, 1996a).

La revacunación se recomienda para las gestaciones siguientes.

III.- Justificación

Se conoce la transmisión transplacentaria de *Neospora caninum* en el bovino, esta es la causa por lo cual la enfermedad permanece en un hato lechero produciendo una gran cantidad de abortos, también es importante la participación del perro en el ciclo biológico, en conjunto con esto las pérdidas económicas son considerables.

En los hatos lecheros teniendo en cuenta estos datos y considerando que hay poca información y estudios sobre dicha enfermedad que causa este parásito en la región lagunera, la finalidad de esta investigación, es realizar un estudio retrospectivo de neosporosis de 581 sueros que se remitieron a la Unidad de Diagnostico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna donde se utilizó el método de ELISA.

IV.- Objetivos

- 1) Analizar los registros de casos remitidos a la Unidad de diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro de Septiembre del 2001 a Septiembre del 2002.
- 2) Identificar los casos de estudio serológico de *Neospora caninum* de bovinos Holstein hembras de la Comarca Lagunera.
- 3) Conocer la prevalencia de *Neospora caninum* en la Comarca Lagunera.

V.- Material y métodos

Para la realización de esta investigación, se analizaron los libros de registros de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, de donde se obtuvieron los datos de los abortos ocurridos desde septiembre del 2001 a septiembre del 2002, de los cuales se tomo la fecha en que fue remitida la muestra o muestras, procedencia (municipio y estado), número de muestras, se obtuvieron los casos positivos, negativos y el porcentaje de casos positivos como se muestran en el cuadro 1.

VI.- Resultados

De la revisión de los libros de registro de la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, Se obtuvieron un total de 27 hatos que remitieron un total de 581 muestras de suero enviadas al laboratorio, de septiembre del 2001 a septiembre del 2002, para analizar por la técnica de ELISA (ver cuadro 1). De las muestras analizadas, 371 muestras fueron positivas a

Neospora caninum y 210 muestras fueron negativas respectivamente mediante el método de ELISA.

De las muestras positivas se obtuvo un promedio general del 64 % de seroprevalencia de *Neospora caninum* existente en la Comarca Lagunera, como se observa en el cuadro 1.

Tabla 4. Comportamiento serológico de *Neospora caninum* en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera.

No. de caso	Fecha	Municipio ó Estado.	No. de muestras	Positivos	% positivos	Negativos
1	24-sep-01	Gómez palacio, Dgo.	59	29	49.1	30
2	13-dic-01	Gómez palacio, Dgo.	6	3	50	3
3	19-dic-01	Gómez palacio, Dgo.	10	4	40	6
4	12-ene-02	Gómez palacio, Dgo.	8	7	87.5	1
5	26-feb-02	Torreón, Coahuila.	15	12	80	3
6	28-feb-02	Gómez palacio, Dgo.	42	19	45	23
7	18-mar-02	Fco. I Madero, Coah.	3	2	66	1
8	26-mar-02	Torreón, Coahuila.	11	5	45.4	6
9	29-mar-02	Gómez palacio, Dgo.	2	2	100	0
10	26-abr-02	Torreón, Coahuila.	30	14	46.6	16
11	30-abr-02	Gómez palacio, Dgo.	17	14	82.3	3
12	03-may-02	Torreón, Coahuila.	41	33	*80.4	8
13	20-may-02	Gómez palacio, Dgo.	6	5	83.3	1
14	24-may-02	Gómez palacio, Dgo.	11	8	72.7	3
15	24-may-02	Gómez palacio, Dgo.	4	3	75	1
16	28-may-02	Gómez palacio, Dgo.	4	3	75	1
17	30-may-02	Villa Juárez, Dgo.	12	7	58.3	5
18	26-jun-02	Gómez palacio, Dgo.	11	9	81.8	2
19	01-jul-02	Gómez palacio, Dgo.	40	33	75	7
20	10-ago-02	Torreón, Coahuila.	40	33	75	7
21	17-ago-02	Gómez palacio, Dgo.	10	9	90	1
22	31-ago-02	Lerdo, Dgo.	28	6	*21.4	22
23	03-sep-02	Torreón, Coahuila.	90	69	76.6	21
24	04-sep-02	Gómez palacio, Dgo.	3	1	33.3	2
25	06-sep-02	San Pedro, Coah.	15	6	40	9
26	06-sep-02	Gómez palacio, Dgo.	13	7	53.8	6
27	23-sep-02	Torreón, Coahuila.	50	28	56	22

Totales	581	371	64.42 %	210
----------------	------------	------------	----------------	------------

VII.- Discusión

En la presente investigación, encontramos resultados muy semejantes y otros diferentes a los obtenidos en la literatura a nivel mundial, en donde se mencionan los porcentajes de serorreactividad.

El presente estudio presento un 64.42 % de seroprevalencia.

Delgado en 1996, analizó 120 fetos de bovinos Holstein abortados entre los tres y ocho meses de gestación.

En España Cebrian *et al*, (2000). estudiaron el 55.1% en ganado de carne y el 83.2% en ganado de leche de animales seropositivos.

Rivera *et al* (1998) en el valle de Lima realizaron un estudio para investigar la presencia de *Neospora Caninum*, los fetos tenían de 3 a 7 meses de edad, el 62.1% (18/29) de las vacas abortadas presentaron anticuerpos contra *N. caninum*.

Zambrano *et al*.(2001) en un estudio no formal aleatorio sobre 354 vacas lecheras de la Sabana de Bogota y Nariño en Colombia, encontraron un seroreactividad del 54%. La técnica utilizada fue ELISA.

Rojas (2003) cita prevalencias de 12.1 a 77% en las vacas de algunos países de América, Europa y Australia.

Morales y col., (1998): estudiaron 211 fetos, en 104 (49.28%), se pudo identificar la causa de aborto.

En Francia Cebrian *et al*. (2000). han encontrado cifras de un 26%, y en Nueva Zelanda del 39%.

Echaide y Valentín. (2000). Realizaron en 1998 en Córdoba y Santa Fe, Argentina, un estudio serológico que incluyó 8 hatos de la cuenca central. El 34% de 320 vacas analizadas tenían anticuerpos contra *Neospora caninum*. De este estudio también se concluyó que el 27%, promedio, de las vacas pertenecientes a esos hatos estaban infectadas por este parásito. El análisis de 69 muestras de sueros de fetos mayores a 5 meses de edad en la misma región, mostró un total de 18 rectoras serológicas que representaron el 26%.

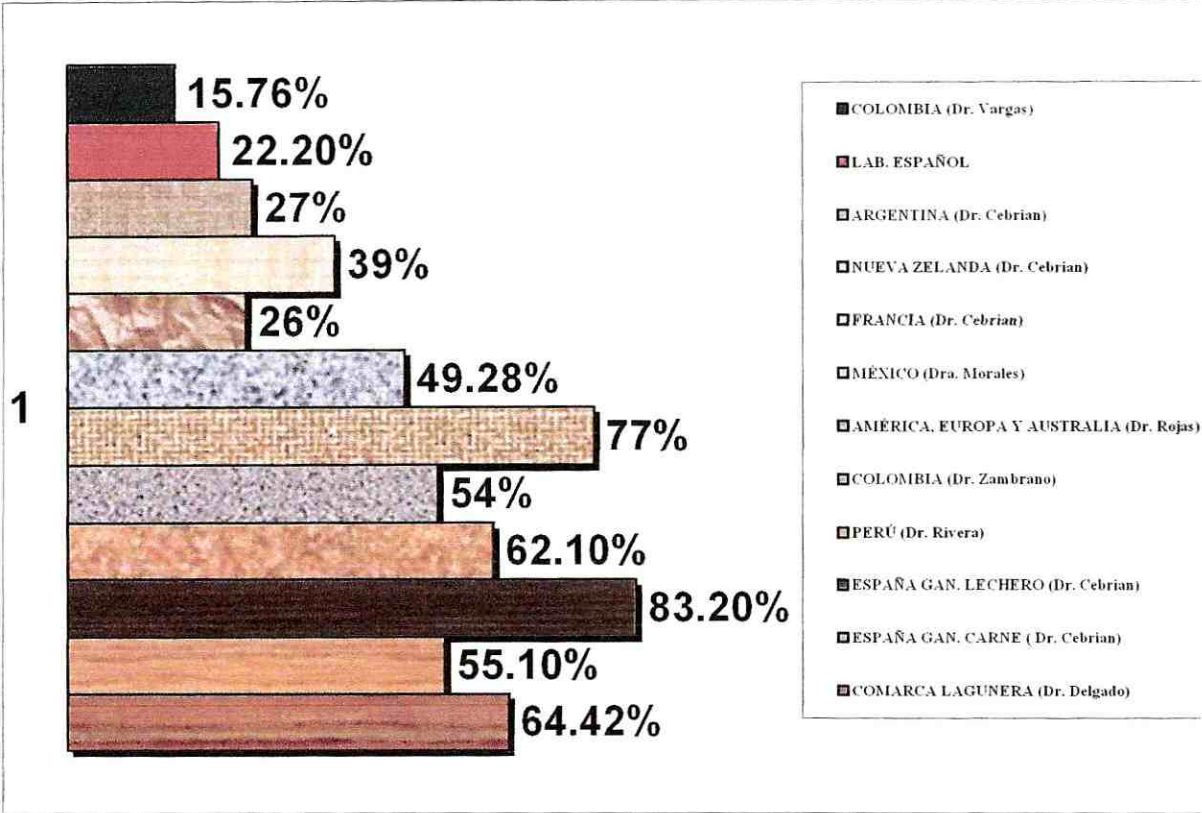
En España hay datos del laboratorio AZTI-SIMA de 378 fetos analizados en los años 96-97 de los cuales 84 (22.2%) fueron diagnosticados como causa la *Neospora*.

Y Vargas en el 2000, en un estudio sobre vacas gestantes de 2 a 9 meses, encontró el 15.76 % de seropositividad a la presencia de anticuerpos antineospora caninum, en Florencia, Colombia (Caquetá).

El 64.42% (371/581) contaron con un promedio de 3 a 8 meses de gestación. Dando un rango del 21.4% y 80.4% de seroprevalencia.

En cuanto a la edad de los fetos la mayoría fluctuó de 4 a 6 meses de edad (Calzada *et al.* (2001); Zambrano *et al.*, (2001); Oviedo, 2003; Bryan *et al.*, (1994) y Ortega *et al.*, (2001).

Grafica 1. Porcentajes de prevalencia de *Neospora Caninum* en algunos países comparados con la comarca lagunera.



Como se puede concluir en otros países tienen una seroprevalencia similar que pudo observarse en el presente estudio.

III.- Literatura citada

- 1.-Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL v Conrad PA. (1991): Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* ; 198:241-244.
- 2.-Barr, BC, Rowe, JD, Sverlow, KW, Bondurant, R.H., Ardans, A.A., Oliver, M.N, y Conrad, P.A (1994): Experimental Reproduction of bovine Fetal Neospora Infection and Death with a Bovine Neospora Isolate. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 6(2): 207-215.
- 3.-Barr B., Anderson M, Severlow K, y Conrad P(1995): Diagnosis of bovine fetal Neospora infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet. Rec.* ; 137: 611-613.
- 4.-Benavides O. E (1992). Manual de plagas y enfermedades, edición No 72.
- 5.-Bjerkas I, Mohn SF. y Presthus J (1984). Unidentified cystforming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, 70: 271-274.
- 6.-Bryan L, Gajadjar A, Dubey J y Haines D (1994): Bovine neonatal encephalomyelitis associated with Neospora spp. *Protozoan. Can. Vet.* 35: 111-113
- 7.-Calzada C P, Morales SE, Quiroz RGF, Salmeron SF., García O C, Hernández B J (2001). Valores hematológicos en vacas de raza Holstein-Friesian seropositivas a Neospora caninum en la cuenca lechera de Tízayuca, Hidalgo, México, *Rev. Vet. Mex.* 33 (2): Pág. 119-124.

- 8.-Cebrian L M, Barberan M y Ferree LM (2000): Neosporosis y aborto en el ganado vacuno, Dpto. de Patología animal. Inf. Técnica parasitología Laboratorios Provet S.A.
- 9.-Conigliaro S (1997): Neosporosis causa de problemas reproductivos. Centro Diagnóstico Veterinario S.A. boletín 13. *Revista de la CABIA*. año 10 No 33.
- 10.-Cordero CM, Rojo VF, Martínez FA, Sánchez AM, Hernández RS, Navarrete LI, Diez BP, Quiroz RH y Carvalino VM (1999) Neosporosis Parasitología veterinaria, Págs. 330-332 y 668-669.
- 11.-Corvin, RM y Nahm J. (1997): Phylum Protozoa. Veterinary Parasitology Web Site. University of Missouri, College of Veterinary Medicine. <http://www.parasitology.org/Taxonomy>.
- 12.-Choromanski, L. (1996a): Evaluación en campo de la seguridad de la vacuna de neospora caninum, boletín técnico No 1; Intervet inc.
- 13.-Choromanski, L (1996b): La evaluación de la nueva vacuna neoguard, vacuna contra neospora caninum, como auxiliar en la reducción de abortos en vaquillas saludables y preñadas desafiadas con neospora caninum, boletín técnico No 2; intevet inc.
- 14.-Davison, HC, Otter A y Trees, A. J. (1999): Significance of Neospora caninum in British Dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *International Journal of Parasitol* 29: 1189-1194.
- 15.-Delgado G. R (1995). Patología del aborto en bovinos Holstein. Memorias del IV Congreso de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios A.C. Pág. 53;

Toluca, Estado de México.

- 16.-Delgado G. R (1996). Descripción de las lesiones causadas por *Neospora* spp. En fetos de bovinos Holstein de la comarca lagunera. Memorias del V Congreso de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios A.C. Pág. 11,12; Querétaro, Qro.
- 17.-De Luca L. (2001): Aborto bovino, Laboratorios Burnet, Rev. Ganadería, B. A. Argentina. Cuencarural.com.ar
- 18.-De Luca L. (2003): Diagnóstico del aborto infeccioso bovino, Laboratorios Burnet, Rev. Ganadería, B. A. Argentina. Cuencarural.com.ar
- 19.-Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ y Gula A. (1998): Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet. Med. Assoc.* 192:1269-1285.
- 20.-Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS y Topper MJ. (1988): Neonatal neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmisión. *J Am Vet Med Assoc.* 193:1259-1263.
- 21.-Dubey JP y Lindsay DS (1996): A review of neospora caninum and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67: 1-59.
- 22.-Dubey JP, (1999a): Parasitología Veterinaria. Neosporosis. Págs. 349-367. www.fcv.unlp.edu.ar/parasitología/neosporosis_2001.doc
- 23.-Dubey JP (1999b): Recent advances in Neospora and Neosporosis. *Vet. Parasitol.* 1599: 1-9.
- 24.-Echaide I. y Valentín B (1997): La neosporosis en los bovinos lecheros. Publicación Miscelánea No 89; Pág. 91. Información técnica para productores.
- 25.-Echaide I. y B. Valentín (2000a): La Neosporosis en rodeos lecheros. Revista

INTA EEA Rafaela; chacra No 832; Pág. 130.

26.-Echaide I. y Valentín (2000b): Neosporosis bovina en los rodeos lecheros de la cuenca central Argentina. Estación Experimental Agropecuaria Rafaela del INTA.

27.-Forsythe L (2000): Neosporosis en ganados lecheros. Seguridad veterinaria provincial del alimento y salud animal, agricultura y alimento de Saskatchewan, Canadá.

28.-Gómez EJ (1998): *Neosporosis bovina*, una enfermedad abortiva emergente en el mundo. *Rev. El Cebú, Asocebu, Colombia*, 310: 10-14.

29.-Greene C (1999): Infectious diseases of the dog and cat. *Academic press*.

30.-Lindsay D, Dubey J, Blagburd B (1996): Finding the cause of parasite induced abortions in cattle. *Veterinary Medicine*: 64-71.

31.-Meléndez P (1999): Evidencia serologica de *Neospora caninum* en un rebaño lechero de la zona central de Chile, *Avances en Ciencias Veterinarias*, Vol. 14; (1 y 2);, (enero- diciembre).

32.-Morales SE., Trigo TF., Puente CE., Santa CM., Ibarra VF (1997): Avances en el diagnostico de la Neosporosis bovina en México. Memorias del VI Congreso de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios A.C. Pág. 8-10; Guadalajara, Jalisco, México.

33.-Ortega ML y Pereira BJ (2001): La neosporosis como causa de aborto y mortalidad neonatal en el ganado bovino, proyecto de investigación AGF 98-0804-CO-02.

34.-Otter A, Jeffrey M, Scholoes S, Helmick B, Wilesmith J y Trees A (1997):

- Comparison of histology with maternal and fetal serology for the diagnosis of abortion due to bovine neosporosis. *Vet. Rec.* 141: 487-489.
- 35.-Oviedo ST (2003): Neosporosis bovina, Agenda informativa Ganacor, Federación Ganadera de Córdoba, Montería, Colombia.
- 36.-Pare J y Hietala SK, Thurmond MC. (1995): An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of neospora sp. Infection in cattle. *J. Vet. Diag. Invest* ; 7: 352- 359.
- 37.-Pare J, Thurmond MC y Hietala SK. (1996): Congenital neospora caninum infection in dairy cattle and associated calf-hood mortality. *Can J. Vet. Res.* 60: 133-139.
- 38.-Pare J, Thurmond MC y Hietala SK. (1997): Neospora caninum antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83: 82-87.
- 39.-Pereira J, Vagnoni L, Blanco VF y Vagnozzi A (1993): Aborto inducido por Neospora sp en ganado bovino. Publicado en *The Compedium.* 15(6)
- 40.-Rivera GH, Nelson D y Tabacchi N. L (1998): Neospora caninum y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del valle de lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú;* 11(1): 1-7.
- 41.-Rivera, GH y Benito, ZA (1999): Etiología infecciosa del aborto bovino. *Visión Artículos Veterinaria.*
- 42.-Rojas CM (2003): Neoporosis canina, Rev. Virtual de Parasitología Veterinaria Peruana. <http://www.visionveterinaria.com/tpp.htm>.

- 43.-Thurmond M y Hietala S (1995): Infección por *Neospora caninum* en ganado bovino, California Diagnostic Laboratory System, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA.
- 44.-Williams DJ, Guy CS, Garry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, MacEachern K, Crpps PJ, Kelly DF y Trees AJ (2000). *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: The time of experimentally-induced parasitemia during gestation determines foetal survival. *Paras.* 121: 347-358.
- 45.-Zambrano VJL., Cotrino BV, Jiménez EC, Romero M y Guerrero B (2001) Evaluación serológica de *Neospora caninum* en bovinos en Colombia, *Rev. ACOVEZ.* 26(1): 5-10.