

**TRANSMISIÓN HORIZONTAL Y VERTICAL DE *NEOSPORA CANINUM* EN TRES
SISTEMAS DE CRÍA BOVINA**

Rodríguez Alejandro Martín

Trabajo de tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al título de
MAGISTER SCIENTIAE en SANIDAD ANIMAL

Área de Producción Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

UNIDAD INTEGRADA BALCARCE: FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS,
UNMDP – ESTACIÓN EXPERIMENTAL AGROPECUARIA BALCARCE, INTA

Balcarce, Argentina

Mayo 2015

**TRANSMISIÓN HORIZONTAL Y VERTICAL DE *NEOSPORA CANINUM* EN TRES
SISTEMAS DE CRÍA BOVINA**

MV Rodríguez Alejandro Martín

Director de tesis

Moore Prando Dadin, MV MSc, DMV

Co-Director de tesis

Campero Carlos Manuel, MV, PhD

Comité de Consejeros

Odriozola Ernesto, MV, MsPhil

Späth Ernesto, MV, PhD

Maresca Sebastian, Vet, MSc

Nigro Hugo, MV, MSc

**TRANSMISIÓN HORIZONTAL Y VERTICAL DE *NEOSPORA CANINUM* EN TRES
SISTEMAS DE CRÍA BOVINA**

Rodríguez Alejandro Martín

Aprobada por:

.....
Álvarez García Gema MV, PhD

.....
Cantón Germán MV, PhD

.....
Moré Gastón MV, DMV

DEDICATORIA

A mi familia y a las personas que me han transmitido su pasión por aprender

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que me han ayudado a lo largo de este trabajo y en especial a Prando, Dorita y Carlos.

A los Sebastianes y sus familias.

A Hugo y mis compañeras de INTA Cuenca.

A las personas que trabajan en el campo experimental de INTA Cuenca.

A Ernesto, Germán, Juan y los residentes.

A Ernesto, Joaco y Adriana.

A Anselmo y Marita.

A los laboratorios de Virología y Patología de INTA Balcarce

Y a mi familia...

INDICE GENERAL

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE GENERAL	vii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	4
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Definición	5
3.2. Taxonomía	5
3.3. Ciclo de vida y estadios infecciosos	5
3.4. Rutas de transmisión.....	8
3.5. Determinación de las formas de transmisión	10
3.6. Prevalencia en rodeos bovinos para carne.....	11
3.7. Neosporosis en otras especies.....	11
3.8. Factores de riesgo.....	12
3.8.1. Factores de riesgo de infección	12
3.8.2. Factores de riesgo asociados al aborto.....	15
3.9. Patogenia.....	16

3.10. Signos clínicos	20
3.11. Bases de la respuesta inmunitaria.....	21
3.12. Diagnóstico	22
3.13. Pruebas serológicas.....	24
3.13.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).....	25
3.13.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA)	26
3.13.3. ELISA de avidéz	26
3.13.4. Inmunoblot (IB)	27
3.13.5. Prueba de aglutinación	28
3.14. Situación de la ganadería en la Provincia de Buenos Aires	29
3.15. Impacto económico de la infección por <i>N. caninum</i>	30
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
4.1. Localización del predio.....	32
4.2. Duración del ensayo.....	32
4.3. Animales y diseño experimental	32
4.3.1. Vacas multíparas	32
4.3.2. Vaquillonas de reposición	34
4.3.3. Terneros y terneras.....	34
4.4. Manejo de los sistemas	35
4.5. Cronograma de extracción de sangre.....	35
a) Vacas.....	35
b) Vaquillonas	35

c) Terneros.....	35
4.6. Antígeno para la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)	36
4.7. Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	37
4.8. ELISA de avidéz.....	37
4.9. Análisis de los datos.....	39
4.9.1. Criterios para establecer la seroprevalencia en vacas multíparas.....	39
4.9.2. Incidencia acumulada	39
4.9.3. Riesgo relativo	39
4.9.4. Transmisión horizontal.....	39
4.9.5. Transmisión vertical.....	39
4.9.6. Diagnóstico serológico de neosporosis en caninos	40
4.9.7. Análisis estadístico:	40
5. RESULTADOS	41
5.1. Seroprevalencia a <i>N. caninum</i> en las vacas	41
5.2. Incidencia acumulada (IA).....	41
5.3. Riesgo relativo (RR)	41
5.4. Cinética de respuesta de anticuerpos durante la gestación.....	41
5.5. Prueba de Avidéz.....	42
5.6. Evaluación de la transmisión horizontal.....	42
5.7. Evaluación de la transmisión vertical.....	42
5.9. Diagnóstico serológico de neosporosis en caninos	43
6. DISCUSIÓN.....	44

7. CONCLUSIONES	50
8. BIBLIOGRAFÍA.....	51
9. TABLAS, FIGURAS Y FOTOS.....	72

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y FOTOS

Tabla 1: Seroprevalencia de <i>N. caninum</i> en rodeos para carne encontrados en diferentes regiones del mundo.....	72
Tabla 2: Fetos abortados positivos a <i>N. caninum</i> por IHC en rodeos para carne y leche de Argentina. Adaptado de Moore <i>et al.</i> , 2002.....	73
Tabla 3: Diagnóstico de infección de <i>N. caninum</i> en fetos abortados. Adaptado de Ortega–Mora <i>et al.</i> , 2007.....	73
Tabla 4: Características de cada uno de los sistemas.	73
Tabla 5: Cronograma de sangrados de las vacas multíparas	74
Tabla 6: Cronograma de sangrados de las vaquillonas de reposición.....	74
Tabla 7: Seroprevalencia a <i>Neospora caninum</i> según momentos de muestreo en cada uno de los sistemas utilizando IFI.....	74
Tabla 8: Resultado a la IFI en vacas multíparas según rodeo intensivo (IN), semi-intensivo (SI) y tradicional (T) que presentaron títulos en algún momento a lo largo del trabajo.	75
Tabla 9: Incidencia acumulada en cada uno de los rodeos.....	76
Tabla 10: Riesgo relativo en cada uno de los sistemas.....	76
Figura 1: Cinética de anticuerpos en 30 gestaciones de vacas seropositivas	77
Tabla 11: Resultado del test de avidez	77
Foto 1: Pastoreo directo de avena en el sistema intensivo	78
Foto 2: Autoconsumo de silo de planta entera de maíz en el sistema intensivo	78
Foto 3: Pastoreo de pasturas cultivadas en el sistema semi-intensivo.....	79
Foto 4: Momento en el cual se decidía inmovilizar al ternero recién parido para la obtención de la muestra de sangre previo a la ingestión de calostro	79

Tabla 12: Resultados de la IFI en vaquillonas del rodeo intensivo	80
Tabla 13: Resultados de la IFI en vaquillonas del rodeo semi-intensivo	81
Tabla 14: Resultados de la IFI en vaquillonas del rodeo tradicional	82

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la seroprevalencia y la tasa de transmisión de *Neospora caninum* en bovinos en tres sistemas de cría. El trabajo se realizó en el campo experimental Colonia Ortiz Basualdo, EEA INTA Cuenca del Salado (lat. 37° 5' 7,85"S; long. 57° 52'36,45" O), partido de Ayacucho, provincia de Buenos Aires, Argentina. Se seleccionaron 216 vientres Angus involucrados en 3 sistemas de manejo con 72 hembras elegidas al azar en cada uno categorizados como "intensivo", "semi-intensivo" y "tradicional" (extensivo) según la carga animal y el grado de tecnología implementado. Se obtuvieron muestras de sangre cada 3 meses, aproximadamente, durante un período de 21 meses. Un grupo de 90 vaquillonas, Angus de reposición, integradas en partes iguales por el sistema intensivo (30/90), semi-intensivo (30/90) y tradicional (30/90), fueron evaluadas, de la misma forma, desde los 9 meses hasta los 21 meses de edad. A su vez, se obtuvieron muestras de sangre de un total de 34, 20 y 24 terneros de los mencionados sistemas de cría previo a la ingestión de calostro y a los 7 meses de edad. Las muestras fueron analizadas por la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* considerando un título serológico de ≥ 200 para vacas multíparas, vaquillonas y terneros de 7 meses de edad, mientras que para los terneros, que aún no habían ingerido calostro, fue de ≥ 25 . Se valoró la avidéz de los anticuerpos específicos en animales positivos por IFI mediante el test de ELISA. Durante el período de estudio 5, 4 y 8 vacas multíparas, correspondientes a cada uno de los sistemas de manejo, respectivamente, resultaron ser positivas a la infección por *N. caninum* en alguno de los tiempos analizados. La seroprevalencia acumulada fue de 6,9%, 5,5% y 9,7% para cada uno de los sistemas, respectivamente. Todas las vaquillonas de reposición fueron negativas a la infección por *N. caninum*, independientemente del sistema de manejo implementado. La transmisión vertical fue del 100% para el sistema intensivo y tradicional y de 50% para el sistema semi-intensivo. El análisis de la avidéz de los anticuerpos demostró que la infección estaba presente previo al inicio del trabajo, a su vez, un porcentaje menor de animales en los tres sistemas, presentó baja avidéz de anticuerpos sugiriendo la presencia de una infección primaria. No existieron diferencias significativas (Proced Freq/SAS $p>0,05$) en las seroprevalencias a *N. caninum* entre los sistemas analizados. La transmisión de la neosporosis bovina en sistemas de cría bovina no se incrementó con la intensificación del sistema productivo al menos en el período en estudio y bajo las condiciones de manejo y la población sobre la cual se realizó el seguimiento.

Palabras claves: *Neospora caninum*, transmisión transplacentaria endógena, transmisión transplacentaria exógena, IFI, ELISA de avidéz

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the seroprevalence and the *Neospora caninum* transmission rate in three cattle breeding systems. The study was conducted at the experimental Colonia Ortiz Basualdo station, belonging to the EEA INTA Cuenca del Salado (37°5'7.8"S 57°52'36.45"W), Buenos Aires, Argentina. A total of 216 cows were selected from an intensive, a semi-intensive and a traditional (extensive) breeding system, which differed in the livestock number of and the applied technologies. Serum samples were obtained every 3 months over a period of 21 months. A group of 30 replacement heifers from each system were tested similarly since they were 9 months until they were 21 months old. At the same time, 34, 20 and 24 calves from the intensive, the semi-intensive and the traditional systems, respectively, were bled before colostrum intake and at 7 months of age. The samples were analyzed by indirect immunofluorescence test (IFAT) for detection of antibodies anti-*N. caninum*, considering a serological title ≥ 200 as a criterion of positivity for multiparous cows, replacement heifers and calves with 7 months of age, while in calves prior ingestion to ingestion of colostrum was ≥ 25 . The positive cows were analyzed to evaluate their avidity of the antibodies to the *N. caninum*. During the study, 5, 4 and 8 multiparous cows from each group proved to be positive *N. caninum* infection. The accumulated seroprevalence was of 6.9 in the intensive, 5.5 in the semi-intensive and 9.7 in the traditional systems. There were no positive cases of *N. caninum* infection within the replacement heifers. The vertical transmission was 100% in the intensive and the traditional systems but 50% in the semi-intensive. The analysis of avidity showed that chronic infection was present prior to the onset of labor, in turn, a lower percentage of animals in the three herds, had low antibody avidity suggesting a primary infection. The results showed that there were no significant differences (Proced Freq/SAS $p > 0.05$) in the seroprevalence of *N. caninum* among the systems analyzed. The transmission of bovine neosporosis in cattle breeding herds did not increase in the more intensified systems, at least during the period of the study.

Key words: *Neospora caninum*, endogenous transplacental transmission, exogenous transplacental transmission, IFAT, ELISA avidity

1. INTRODUCCIÓN

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria producida por el protozoo *Neospora caninum* que en el bovino cursa con abortos y nacimientos de terneros con signología neuromuscular o clínicamente sanos, pero congénitamente infectados (Dubey; Lindsay, 1996; Dubey, 1999, 2003). Desde su primera detección en el tejido nervioso de dos fetos bovinos abortados en rodeos lecheros de Nuevo México, EE.UU. (Thilsted; Dubey, 1989), *N. caninum* ha sido asociado a problemas reproductivos en bovinos de las principales regiones ganaderas del mundo (Dubey; Lindsay, 1996). Las pérdidas económicas que ocasiona en rodeos bovinos para carne son considerables (Waldner *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 2013). Sin embargo, poco se conoce acerca de los factores de riesgo que contribuyen a la exposición a *N. caninum* en este tipo de producción (Sanderson *et al.*, 2000, Moore *et al.*, 2009).

Este protozoo puede ser transmitido naturalmente a los bovinos de forma horizontal por la ingestión de alimento o agua contaminados con los ooquistes expulsados en las heces de perros infectados, o muy eficientemente de forma vertical, desde la madre infectada a su cría durante la gestación (Dubey *et al.*, 2006). Diversas especies de animales domésticos (caninos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y equinos) y silvestres (lobos, coyotes, zorros, dingos, ciervos y alces), han sido identificados como hospedadores intermediarios de *N. caninum*, mientras que, los perros (*Canis familiaris*) (McAllister *et al.*, 1998), coyote (*Canis latrans*) (Gondim *et al.*, 2004), dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (King *et al.*, 2010) y el lobo gris (*Canis lupus*) (Dubey *et al.*, 2011) han sido identificados como hospedadores definitivos.

La identificación de anticuerpos a *N. caninum* en un animal es indicativo de la exposición al protozoo. Frecuentemente esta herramienta es utilizada para desarrollar estudios epidemiológicos (Paré *et al.*, 1995; Thurmond *et al.*, 1997; Fort *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2009), para el diagnóstico de aborto (Wouda *et al.*, 1997), o bien para establecer la frecuencia de transmisión de la enfermedad en bovinos (Anderson *et al.*, 1997; Moré *et al.*, 2009). Aunque se ha generado muchísima información respecto a la prevalencia en diferentes regiones, sus resultados no pueden ser comparados por haberse utilizado diferentes técnicas serológicas con sensibilidad y especificidad variables (Dubey *et al.*, 2007). La inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue la primera prueba de diagnóstico serológico utilizada siendo considerada el método estándar para comparación de otras técnicas posteriormente desarrolladas, entre ellas: inmunoblot (IB), prueba de aglutinación y ensayo por inmunoabsorción ligado a

enzimas (ELISA, del inglés *enzyme-linked immuno assay*) (Atkinson *et al.*, 2000).

La producción bovina en Argentina sufre importantes pérdidas por enfermedades que afectan la reproducción y solo se conoce el 45,5% de las causas abortigénicas, de las cuales un 34,4% se consideran de origen infeccioso. En este contexto, *N. caninum* afecta la producción bovina del país siendo responsable del 7,3% de las causas de aborto sobre 354 casos estudiados (Campero *et al.*, 2003). Un trabajo realizado en la región de la pampa húmeda permitió estimar que las pérdidas económicas asociadas al aborto por *N. caninum* en ganado para carne rondarían en más de 12 millones de dólares estadounidenses (Moore *et al.*, 2013). Es por ello que es importante reducir el impacto de dichas pérdidas mediante el conocimiento de sus formas de transmisión y de la posible inmunidad protectora que pudiera ofrecer el parásito en el hospedador, y así poder implementar posteriormente adecuadas medidas de control.

Los estudios de factores de riesgo para infecciones en bovinos con *N. caninum* exploran la asociación entre distintos sistemas de manejo para la cría bovina y el nivel de infección por dicho agente. Este tipo de estudio es principalmente usado para generar hipótesis, de manera que los resultados indican asociación y grado de magnitud de la misma (Barling *et al.*, 2001; Fort *et al.*, 2015). A su vez, tienen importancia en el desarrollo de estrategias para controlar o prevenir la enfermedad, sobre todo en ausencia de tratamientos o vacunas efectivas disponibles para el bovino (Otranto *et al.*, 2003; Schares *et al.*, 2004). Distintas causas juegan un rol determinante en la presentación de la neosporosis bovina, como por ejemplo la presencia de perros u otros cánidos (Bartels *et al.*, 1999). También se ha mencionado la inmunosupresión debido a la presencia de micotoxinas en el alimento (Bartels *et al.*, 1999) o infecciones virales concomitantes (Björkman *et al.*, 2000). Diferentes factores de manejo asociados con el incremento de la seroprevalencia de la neosporosis en el ganado bovino han sido mencionados, como la carga animal por hectárea, la suplementación de heno con el uso de portarrollos, la presencia de la fauna silvestre, los patrones estacionales de parto y el uso de vaquillonas de reposición propias, entre otras (Sanderson *et al.*, 2000; Barling *et al.*, 2001). En cambio, existe información contradictoria respecto a la presencia de otros factores los cuales parecen tener un efecto opuesto como el pastoreo de verano, el uso de un perro de trabajo en el ganado y el uso de alimentadores de autoconsumo (Sanderson *et al.*, 2000; Barling *et al.*, 2001). Es conocido que a medida que un sistema para carne o leche se intensifica, la exposición de los bovinos a los ooquistes de *N. caninum* puede ocurrir con mayor frecuencia (McAllister *et al.*, 2000). En Argentina, también se ha sugerido que las

prácticas de manejo asociadas a una mayor intensificación pueden aumentar la prevalencia de *N. caninum* en rodeos para carne (Moore *et al.*, 2009). En Texas, EE.UU., la seroprevalencia de *N. caninum* en terneros para carne se incrementó cuando la carga animal fue mayor de una unidad de vaca / ternero por 2,2 ha (Barling *et al.*, 2001).

La cuenca del río Salado es una importante área de cría bovina de la pampa húmeda en Argentina (MINIAGRI 2014). La ganadería es de tipo extensivo donde los pastizales naturales son predominantes (>70%) (Deregibus; Cauhépe, 1983), con escasa participación de pasturas, verdes y otros tipos de alimentación. En los últimos años se ha generado un importante cambio en su situación productiva, pasando de un área netamente ganadera de cría extensiva a una región recriadora-invernadora de ciclo corto basada principalmente en pastizales naturales, con aumento de la carga animal histórica debido a un incremento en la superficie destinada a la agricultura (Vázquez *et al.*, 2006). Este contexto lleva a tener que realizar un mejor aprovechamiento de los recursos naturales. Dicho cambio histórico, en una zona donde inicialmente fue proveedora de terneros únicamente y que luego pasó a ser un área recriadora de terneros, hace que surja la necesidad de estudiar diferentes factores relacionados a la neosporosis bovina en estos sistemas de cría, entre ellos su transmisión, los factores de riesgo y las consecuencias.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS

La transmisión de la neosporosis bovina en rodeos para cría bovina se incrementa a medida que se intensifica el sistema de producción.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la frecuencia de transmisión horizontal y vertical de *N. caninum* en sistemas de cría bovina con tres niveles de intensificación en la región de la Cuenca del Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina.

Objetivos específicos:

Establecer la seropositividad a *N. caninum* en vacas multíparas en tres sistemas con niveles diferentes de intensificación.

Evaluar el efecto de la intensificación en cada sistema sobre la frecuencia de transmisión vertical y horizontal de la enfermedad.

Realizar un estudio longitudinal en vacas multíparas durante 21 meses para evaluar el desarrollo y la cinética de anticuerpos específicos.

Evaluar los estadios de la infección por *N. caninum* analizando la avidéz de los anticuerpos específicos mediante una prueba de ELISA.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Definición

La neosporosis bovina es una enfermedad de distribución mundial causada por el protozoo intracelular *Neospora caninum*. Se caracteriza por producir abortos, momificación fetal, partos prematuros y nacimiento de terneros con ataxia, parálisis, incoordinación o débiles (Dubey, 1999; Dubey *et al.*, 2007).

Neospora caninum fue reconocido inicialmente en 1984 (Bjerkas *et al.*, 1984) en Noruega, tras describir un síndrome de encefalomiелitis y miositis en perros jóvenes. Por su similitud morfológica fue clasificado erróneamente como *Toxoplasma gondii* hasta que Dubey *et al.*, (1988) propuso la denominación actual como un nuevo género y especie: *N. caninum*. Posteriormente se aisló el agente en cultivo celular y se reprodujo la infección experimentalmente en el perro (Dubey *et al.*, 1988). El desarrollo de las pruebas serológicas [inmunofluorescencia indirecta (IFI)] y de la inmunohistoquímica (IHQ) permitieron mejorar la caracterización de la enfermedad (Bjerkas; Dubey, 1991).

3.2. Taxonomía

Neospora caninum es un protozoo del phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoa*, subclase *Coccidia*, orden *Eucoccidia*, suborden *Eimeriina*, familia *Sarcocystidae* y género *Neospora* (Dubey *et al.*, 2003; 2007). Este agente está relacionado taxonómicamente a otros protozoos como *Haemmondia heydorni* e *Isospora bigemina* y tiene una estrecha relación taxonómica con los integrantes de la subfamilia *Toxoplasmatinae* como por ejemplo *T. gondii* (Dubey *et al.*, 2002). *Neospora caninum* tiene un ciclo de vida heteroxeno, habiéndose reconocido hasta el momento como hospedadores definitivos al perro (*Canis familiaris*) (McAllister *et al.*, 1998), al coyote (*Canis latrans*) (Gondim *et al.*, 2004), al dingo australiano (*Canis lupus dingo*) (King *et al.*, 2010) y al lobo gris (*Canis lupus*) (Dubey *et al.*, 2011). Un amplio rango de animales domésticos y salvajes pueden actuar como hospedadores intermediarios (Dubey; Lindsay, 1996). Pese al rango de hospedadores solo pudo ser aislada en forma viable de algunos pocas especies (bovinos, ovinos, búfalo de agua, perro, caballo, visón y ciervo de cola blanca) (Dubey; Schares, 2011).

3.3. Ciclo de vida y estadios infecciosos

En su ciclo presenta tres estadios parasitarios: taquizoitos, bradizoitos y esporozoitos (contenidos en los ooquistes) (Dubey *et al.*, 2007). Los taquizoitos y

bradizoitos son formas de proliferación asexual y se encuentran en los tejidos de un hospedador infectado (intermediario y definitivo). Mientras que los esporozoitos son el resultado de la división pos-cigótica que ocurre en el medio ambiente y se encuentran dentro de los ooquistes maduros o esporulados. Los ooquistes son excretados en las heces de los hospedadores definitivos inmaduros conteniendo solo una célula o cigoto (McAllister *et al.*, 1998).

Los taquizoitos son ovoideos, globulares o semilunares, miden de 5 a 7 μm de largo y 1 a 2 μm de ancho (Dubey; Lindsay, 1996; Hemphill *et al.*, 1999), poseen un núcleo central y carecen de gránulos de amilopectina (a diferencia de los bradizoitos) (Dubey *et al.*, 2006). Estos se dividen rápidamente dentro de las células y han sido detectados en neuronas, macrófagos alveolares, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células renales, hepatocitos y trofoblastos de placenta (Barr *et al.*, 1991 a; Dubey *et al.*, 1996; Dubey *et al.*, 2002). Los bradizoitos miden aproximadamente 6 a 8 μm de largo y 1 a 2 μm de ancho (Hemphill *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2002) y poseen un núcleo de localización terminal, a su vez contienen gránulos de amilopectina (Dubey *et al.*, 2006). Estos últimos tienen una replicación más lenta que los taquizoitos y pueden ser diferenciados de estos a través de IHQ (McAllister *et al.*, 1998). Los bradizoitos están contenidos en quistes tisulares que a su vez se encuentran dentro de las células. La forma de los quistes tisulares es redonda u oval y miden hasta 107 μm , dependiendo del número de bradizoitos que contengan (Dubey *et al.*, 2002). Poseen, a su vez, una gruesa pared que protege al parásito de reacciones inmunológicas y físicas por parte del hospedador. A su vez, el espesor de la pared dependerá del tiempo de infección (Jardine, 1996). Los quistes tisulares han sido observados en el sistema nervioso central (SNC) y músculo esquelético de fetos y terneros (Peters *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2002) mientras que aún no se han observado estas formas en secciones histológicas en bovinos adultos naturalmente infectados. Sin embargo, *N. caninum* ha sido aislado del cerebro de dos vacas clínicamente normales que habían parido terneros infectados (Sawada *et al.*, 2000; Okeoma *et al.*, 2004). Por último, los ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo son esféricos o subesféricos, miden 10 a 11 μm , no tienen color y en estado maduro o infectante contienen dos esporocistos con cuatro esporozoitos cada uno (McAllister *et al.*, 1998). Son excretados en un estado inmaduro y esporulan en 24-72 horas (Dubey *et al.*, 2007). El tiempo de sobrevivencia de los ooquistes en el medio ambiente no se conoce con exactitud. Sin embargo, se asume que tienen una resistencia similar a los de *T. gondii* (Dubey, 2004). Diferentes tratamientos físicos (a 100°C durante un minuto) o

químicos (exposición a 10% de hipoclorito de sodio por una hora), resultaron ser las únicas formas efectivas para inactivar los ooquistes (Alves *et al.*, 2011). Se asume que el período de prepatencia en perros es de 5 días o más y permanecen como eliminadores durante un plazo de uno a varios días (Dubey *et al.*, 2007). Experimentalmente, se ha determinado la presencia de ooquistes en heces de perros luego de 30 días de haber ingerido placentas de vacas seropositivas (Dijkstra *et al.*, 2001). A su vez se ha observado en cachorros, en forma experimental, la eliminación de ooquistes a través de materia fecal durante 2 a 3 días tras ingerir cerebro y membrana corioalantoidea aviar que contenían estadios infecciosos de *N. caninum* (Cedillo *et al.*, 2008). Por otra parte, la eliminación de ooquistes en materia fecal por parte de un caninos naturalmente infectados (Basso *et al.*, 2001; Šlapeta *et al.*, 2002; McGarry *et al.*, 2003), puede ser infrecuente (Basso *et al.*, 2001), aunque en ocasiones se ha observado que esta eliminación puede ser por períodos prolongados (McGarry *et al.*, 2003). Es factible que el tipo de alimento contaminado que ingieren los perros, así como la edad y el estado inmunitario de los mismos, afecten la eliminación de ooquistes (Dubey *et al.*, 2007).

Los tres estadios infecciosos de *N. caninum* (taquizoitos, bradizoitos y ooquistes con esporozoitos) están involucrados en la transmisión del parásito (Dubey *et al.*, 2007). Los cánidos que actúan como hospedadores definitivos pueden adquirir la infección a partir de la ingestión de tejidos que contengan quistes intracelulares. Hay evidencia que la ingestión de tejidos placentarios provenientes de vacas naturalmente infectadas pueden ser una ruta de infección de importancia para los caninos. *N. caninum* fue aislada de 20 g de muestra de placenta de 3 vacas naturalmente infectadas que habían parido 9 terneros sanos pero congénitamente infectados durante 3 preñeces consecutivas (Fioretti *et al.*, 2003), a su vez ooquistes de *N. caninum* fueron eliminados, a través de materia fecal, por perros naturalmente infectados a partir del consumo de placentas (Dijkstra *et al.*, 2001). Experimentalmente, también se ha reportado la eliminación de ooquistes por materia fecal en perros tras ingerir tejidos de búfalo de agua (Rodríguez *et al.*, 2004) y ciervo de cola blanca (Vianna *et al.*, 2005) naturalmente infectados. Al llegar al estómago, el quiste se mantiene intacto gracias a la resistencia de su pared a la acción de las enzimas y jugos gástricos, permitiendo que los bradizoitos sean liberados en la luz intestinal donde iniciarán el ciclo entero-epitelial (Dubey *et al.*, 1996). Luego de realizar un fase de reproducción asexual y sexual en el intestino, los ooquistes son eliminados en las heces del hospedador definitivo (Dubey *et al.*, 2007). Recientemente se ha

logrado demostrar el proceso de esquizogonia y gametogonia que precede a la formación del ooquiste en el intestino del hospedador definitivo en un cachorro naturalmente infectado (Kul *et al.*, 2015). Por otro lado, los herbívoros se infectan por ingerir agua o alimento contaminado con ooquistes. Existe una segunda forma más eficiente de transmisión en los herbívoros que es a partir de la vía transplacentaria (Dubey *et al.*, 2007).

3.4. Rutas de transmisión

En los bovinos existen dos vías de transmisión posibles de la enfermedad: la vía horizontal y la vía vertical (Anderson *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2006). En bovinos, *N. caninum*, se transmite en forma post-natal (transmisión horizontal) por consumo de agua o alimento contaminado con ooquistes esporulados. También puede provocarse, de manera muy eficiente, desde la madre al feto en forma transplacentaria (transmisión vertical). Esta última forma de transmisión contribuye significativamente a la persistencia de la enfermedad en el rodeo, ya que las vacas pueden quedar infectadas de por vida, propagando la infección a través de varias generaciones en forma consecutiva o intermitentemente (Boulton *et al.*, 1995; Guy *et al.*, 2001; Fioretti *et al.*, 2003; Pabón *et al.*, 2007). Diferentes estudios (Anderson *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2006; Moré *et al.*, 2009) han demostrado que la probabilidad de infección congénita varía desde el 40,7% al 95%.

Según su origen, la transmisión transplacentaria, puede ser exógena o endógena (Trees; Williams, 2005). La denominada exógena se refiere a las madres gestantes que sufren una primo-infección a partir de la ingestión de agua o alimento contaminados con ooquistes (transmisión horizontal), que van a estar expuestas al mismo tiempo y que pueden producir un brote de abortos epidémicos. La tasa de abortos va a depender de factores como la dosis infectiva ingerida, la patogenicidad de la cepa actuante y la susceptibilidad de las madres (McAllister *et al.*, 2000). En contraste, la reactivación de la infección latente en las madres durante la gestación (transmisión transplacentaria endógena) puede ocasionar abortos, aunque en la mayoría de los casos nacen terneros congénitamente infectados sin signos clínicos (Paré *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2007). Este modo de transmisión es predominante y altamente eficiente ya que muchos establecimientos mantienen una tasa de prevalencia más o menos constante a lo largo de los años con una correlación casi perfecta entre la

seropositividad de las madres y sus terneros, sin que exista una aparente fuente externa de infección. Por otro lado, la tasa de infección transplacentaria endógena puede disminuir en preñeces subsecuentes, indicando el desarrollo de inmunidad (Dubey *et al.*, 2007). Utilizando modelos matemáticos se comprobó que bajos niveles de transmisión horizontal podrían explicar el mantenimiento de la infección en rodeos de tambo donde la transmisión vertical no alcance el 100% (French *et al.*, 1999).

La transmisión horizontal, responsable de los casos de transmisión transplacentaria exógena, se estima que es menos frecuente. La única forma natural de infección es por la ingestión post-natal de ooquistes esporulados por parte del ganado (De Marez *et al.*, 1999). Por lo general, cuando se detecta esta contaminación externa y, por consiguiente, la transmisión horizontal al ganado, una proporción elevada del rodeo se infecta por primera vez en muy poco tiempo y, con frecuencia, se traduce en un brote de abortos (Schaes *et al.*, 2002; Sager *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2010). La infección latente puede ser adquirida vertical u horizontalmente y el mecanismo de reactivación del parásito no es conocido. La ingestión de alimento contaminado con micotoxinas, las infecciones concurrentes con otros patógenos inmunosupresores, o cualquier causa de estrés durante la preñez, así como también la propia gestación, serían posibles causas de reactivación (Dubey *et al.*, 2007).

En bovinos y otros rumiantes, debido al tipo de placenta (sindesmocorial), no hay transferencia de anticuerpos de la madre al feto durante la gestación. Por lo tanto, la detección de anticuerpos séricos específicos en el feto o el ternero antes de la ingesta de calostro indica contacto con *N. caninum* y síntesis de anticuerpos fetales. Aunque existe la posibilidad que ante diferentes circunstancias de infección los anticuerpos estén ausentes en el feto, por ejemplo, infecciones previas a la inmunocompetencia fetal alrededor de los 120 días de gestación que ocasionen un cuadro de inmunotolerancia (Yao *et al.*, 2009). No se ha comprobado la transmisión entre vacas y no hay evidencia de que alguna forma parasitaria de *N. caninum* esté viable en excreciones o secreciones de vacas adultas infectadas (Davison *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2007). A su vez, se ha demostrado la presencia de ADN de *N. caninum* en leche y calostro (Moskwa *et al.*, 2003; 2007). Sin embargo, no hay evidencias que la transmisión lactogénica ocurra en forma natural (Davison *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2007).

El ADN de *N. caninum* fue encontrado en el semen de toros natural y experimentalmente infectados (Ortega-Mora *et al.*, 2003, Caetano da Silva *et al.*, 2004;

Ferre *et al.*, 2005). En forma experimental se evidenció que las vaquillonas pueden infectarse por vía intrauterina al utilizar semen contaminado experimentalmente con taquizoitos viables (Serrano-Martínez, *et al.*, 2007). Los resultados sugieren que la cantidad de taquizoitos viables en condiciones naturales en semen sería insuficiente para ocasionar una infección (Dubey *et al.*, 2007).

3.5. Determinación de las formas de transmisión

La transmisión vertical es considerada la ruta más importante en la infección por *N. caninum* (Paré *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; Davison *et al.*, 1999). La evaluación de títulos de anticuerpos anti-*N. caninum* previo a la ingestión de calostro provee evidencia de transmisión vertical, ya que como se mencionó anteriormente, los anticuerpos maternos son incapaces de atravesar la placenta bovina, por lo tanto se asume que la presencia de anticuerpos en un ternero antes de ingerir calostro sería producto de una exposición intrauterina. Mediante IFI, anticuerpos detectables a la dilución 1:25 en los fluidos fetales confirma la infección (Wouda *et al.*, 1997). La frecuencia de transmisión vertical puede ser estimada por el número de terneros seropositivos que aún no han ingerido calostro nacidos de hembras seropositivas. La transmisión horizontal puede ser estimada a través de la diferencia entre la seroprevalencia en terneros, previa ingestión de calostro, y la seroprevalencia en vacas adultas, en el mismo momento, asumiendo que la diferencia entre las seroprevalencia es debida a que adquirieron la enfermedad de manera post natal. A su vez se puede establecer por reevaluar a los 4 meses de edad a terneros que al momento del sangrado previo a la ingestión de calostro hayan resultado seronegativos (Hietala; Thurmond, 1999; Bartels *et al.*, 2007; Moré *et al.*, 2009).

La determinación de la principal ruta de infección es un factor para considerar a la hora de establecer medidas preventivas y de control (Moré *et al.*, 2009). La transmisión horizontal en el ganado vacuno se caracteriza por la ausencia de relación en el título de anticuerpos entre madre e hija, por la seroconversión o presencia de anticuerpos en animales previamente negativos a *N. caninum* y/o por la presentación de episodios de abortos relacionados con el parásito (Dijkstra *et al.*, 2001; 2002, 2003). En rodeos donde la transmisión vertical es la predominante, es posible observar que los animales positivos se agrupan en ciertas familias (Schaes *et al.*, 1998) en el que la transmisión puede alcanzar hasta 95% (Davison *et al.*, 1999), donde las vacas infectadas presentan elevadas proporciones de transmisión transplacentaria (López-Gatius *et al.*, 2004).

3.6. Prevalencia en rodeos bovinos para carne

Los porcentajes de seroprevalencia obtenidos en diferentes estudios son muy variados y muchas veces de difícil comparación (Dubey *et al.*, 2007). Se observan diferencias en la prevalencia en función del país, región, técnica diagnóstica utilizada, punto de corte, tamaño de muestra seleccionado y características del muestreo (Thurmond *et al.*, 1997). A su vez, existen trabajos que demuestran una asociación entre la seroprevalencia y los factores de manejo (Barling *et al.*, 2001; Fort *et al.*, 2015). Existen numerosos estudios serológicos en rodeos bovinos para carne y la infección se ha descrito en todo el mundo, obteniéndose tasas de prevalencia de rodeo e individual elevadas (Dubey; Lindsay, 1996; Dubey, 2003). La Tabla 1 muestra una selección de estudios de seroprevalencia individual en el ganado bovino para carne, sin embargo los datos no son comparables por lo citado anteriormente.

3.7. Neosporosis en otras especies

La neosporosis ha sido asociada con abortos esporádicos en cabras (Barr *et al.*, 1992; Eleni *et al.*, 2004) y ovejas (Dubey; Lindsay, 1996; Hässig *et al.*, 2003). Las ovejas han sido utilizadas satisfactoriamente en la reproducción experimental de la enfermedad como modelo de la neosporosis bovina (Buxton *et al.*, 1998). A su vez *N. caninum* ha sido reportado como causa de abortos en equinos (Dubey; Porterfield, 1990) y camélidos (Serrano-Martinez *et al.*, 2004). En otras especies, como el zorro colorado, mapache, antílope, rata, ratón, se halló ADN de *N. caninum*, aunque no se ha podido aislar al parásito en forma viable. En el ciervo de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*), ciervo de Eld (*Cervus eldi siamensis*), ciervo dama (*Dama dama*), llama, alpaca, rinoceronte y cabra, no se han podido aislar aunque se han identificado parásitos utilizando la técnica de IHQ (Dubey *et al.*, 2007).

Neospora hughesi está estrechamente relacionada con *N. caninum* y se ha descrito recientemente que persisten en poblaciones equinas a través de la infección transplacentaria endógena. En equinos, la seroprevalencia a *N. caninum* puede superar el 10%, pero sólo unos pocos casos de neosporosis clínica se han notificado desconociéndose si *N. caninum* o *N. hughesi* o ambas especies, fueron responsables del caso. La infección subclínica por *N. caninum* es relativamente común entre los caballos (Pusterla *et al.*, 2011).

3.8. Factores de riesgo

Actualmente se conocen distintos factores que incrementan el riesgo de infección por *N. caninum*, así como también existen factores asociados a la presencia de abortos. Como principales factores deben considerarse los siguientes.

3.8.1. Factores de riesgo de infección

Edad: Existen trabajos donde se ha demostrado que en rodeos endémicamente infectados con *N. caninum*, los valores de seroprevalencia no difieren en cuanto a la edad de los animales (Paré *et al.*, 1996). Sin embargo también existen trabajos realizados sobre rodeos bovinos infectados endémicamente, donde se ha observado un patrón en el título de anticuerpos en relación a la edad, existiendo valores significativamente más elevados en terneros precalostrales y calostrales comparados con el título promedio de grupos de otras edades. (Anderson *et al.*, 1995; Davison *et al.*, 1999; Pereira-Bueno *et al.*, 2000). Este evento es explicable por la existencia de una transmisión congénita reciente, junto con la reactivación de infecciones latentes durante la gestación y el paso de anticuerpos calostrales de la madre al ternero (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000). A su vez los terneros y vaquillonas, de 7 a 12 meses de edad, presentan títulos inferiores a las categorías adultas (Pereira-Bueno *et al.*, 2000). A su vez se ha observado en esta última categoría que los títulos se incrementan a los 25 meses de edad, en aquellos animales que presentan infección congénita (Hietala; Thurmond, 1999), compatibles con estímulos antigénicos al comienzo de la etapa reproductora. Asimismo, otros autores también han descrito un incremento de la seroprevalencia con la edad (Jensen *et al.*, 1999). Estos hallazgos podrían explicarse gracias a la existencia de posibles factores fisiológicos o de manejo durante la gestación, capaces de producir reactivaciones de la infección crónica como ya fueron mencionados (Hietala; Thurmond, 1999; Quintanilla–Gozalo *et al.*, 2000). Sin embargo, también podría ser debido al contacto con el agente etiológico proveniente de una fuente exógena lo cual confirmaría la existencia de la transmisión horizontal. A su vez, el riesgo de que un animal sea seropositivo aumenta, aunque no en todos los casos, con la edad o número de gestaciones tanto en bovinos lecheros o de cría, sugiriendo que la transmisión horizontal tiene particular importancia en algunos rodeos (Dubey *et al.*, 2007). Por otro lado, considerando la transmisión vertical endógena, la proporción de terneros infectados congénitamente, disminuye al aumentar el número de partos de las hembras, registrando un 80%, 70%, 67% y 66% en vaquillonas, vacas

de segunda parición, de tercera parición y mayores de tercera parición, respectivamente (Dubey *et al.*, 2006).

Sistema de producción: la neosporosis bovina afecta tanto rodeos de cría como lecheros con mayor prevalencia en los últimos (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Moore, *et al.*, 2002). Este podría estar relacionado con el tipo de manejo del ganado y no con una predisposición racial tal como se ha señalado (Thornton *et al.*, 1991; Paré *et al.*, 1998). El sistema de manejo en las explotaciones de leche normalmente es intensivo, mientras que en las de carne es más frecuente extensivo, por tanto el hacinamiento de los animales podría contribuir a una mayor exposición a posibles fuentes de contaminación de ooquistes (alimento, cama, agua, cama, etc.) facilitando las posibilidades de contagio (Dijkstra *et al.*, 2002).

Tamaño del rodeo: Barling *et al.* (2001) demostraron que la seropositividad aumenta a medida que se incrementa la densidad animal. Esto podría deberse a un incremento en la probabilidad de la transmisión horizontal en los rodeos a partir de una fuente puntual de exposición a ooquistes infectantes, lo que probablemente explica, como se mencionó anteriormente, la mayor incidencia en rodeos para leche (Otranto *et al.*, 2003).

Presencia de hospedadores definitivos e intermediarios: con algunas excepciones (Barling *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2003), estudios previos han identificado a los perros, que se encuentran asociados a los rodeos, como un factor de riesgo de infección por *N. caninum*, (Paré *et al.*, 1998; Mainar-Jaime *et al.*, 1999; Ould-Amrouche *et al.*, 1999; Schares *et al.*, 2003) y aborto relacionado a este agente (Bartels *et al.*, 1999). A su vez, existe una relación directa entre el tamaño del rodeo y la seroprevalencia asociado al número de caninos presentes en el establecimiento (Otranto *et al.*, 2003; Schares *et al.*, 2004). Se cree que en las grandes explotaciones existe un menor control sobre el consumo, por parte de los perros, de placentas, fetos abortados y otras fuentes de infección, interviniendo en la diseminación horizontal de la enfermedad (Bartels *et al.*, 1999; Otranto *et al.*, 2003; Corbellini *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007). Además, existe asociación positiva entre la abundancia de cánidos silvestres y la seropositividad de los bovinos. Se ha observado una relación entre la seroprevalencia en el ganado bovino y la abundancia de zorros y coyotes (Barling *et al.*, 2000). Sin embargo, también se ha sugerido que la presencia de perros disminuye la presencia de posibles hospedadores silvestres como el zorro, disminuyendo la seroprevalencia en bovinos (Barling *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2007). A su vez la presencia de otros hospedadores intermediarios también sería un factor de riesgo. Un

estudio (Dubey *et al.*, 2007) demostró la presencia de ADN de *N. caninum* en ratas y ratones infectados naturalmente sugiriendo que estos animales podrían ser una importante fuente de infección para carnívoros. Se ha descrito una mayor seroprevalencia en perros de granja frente a los de zonas urbanas y una asociación significativa entre la presencia de perros en las granjas y el porcentaje de vacas seropositivas (Bartels *et al.*, 1999; Wouda *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2003). A su vez, se han encontrado seroprevalencias mayores en aquellas explotaciones bovinas más próximas a zonas urbanizadas, lo cual es explicable por un mayor densidad de la población canina (Schaes *et al.*, 2003).

Reposición de vientres: en los rodeos seronegativos existe un mayor riesgo de infección cuando se utilizan para reposición vaquillonas de compra (Schaes *et al.*, 2004). Mientras que si la enfermedad es endémica en un establecimiento, la reposición con vientres propios conlleva al mantenimiento de la infección (Barling *et al.*, 2001; Otranto *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2007).

Clima: las condiciones climáticas tienen efecto sobre la esporulación de los ooquistes y sobrevivencia del parásito en el medio ambiente. Temperaturas cálidas y alta humedad incrementan el riesgo de infección posnatal (Bartels *et al.*, 1999). A su vez estas condiciones hacen propenso al crecimiento de hongos y producción de micotoxinas que tras su consumo tienen un efecto inmunosupresor sobre los bovinos, posiblemente favoreciendo la reactivación del parásito (Bartels *et al.*, 1999).

Manejo nutricional: las diferentes prácticas de manejo nutricional, como el traslado de los rodeos fuera del establecimiento, de forma permanente o temporaria, en busca de recursos forrajeros, fue asociado con incremento en la seroprevalencia. Por otro lado, el uso de suplementos nutricionales o cercos para rollos podría incrementar la población de hospedadores intermediarios, como roedores, constituyendo una posible fuente de infección para los hospedadores definitivos (Dubey *et al.*, 2007).

Raza: las diferencias de prevalencia entre razas en estudios realizados en Europa, no sería por variaciones en susceptibilidad, sino por los diferentes sistemas de producción e intensidad en los manejos a los que están sujetos cada una (Bartels *et al.*, 2006). Diferentes estudios han demostrado que la raza Limusín posee una menor prevalencia a la infección por *N. caninum* (Hornok *et al.*, 2006; Armengol *et al.*, 2007) y una menor tasa de abortos ha sido observada cuando se realizaron cruzamientos con Limousin (García-Ispuerto *et al.*, 2005). En estudios previos (López-Gatius *et al.*, 2005), se demostró que el uso de semen de toros para carne reduce el riesgo de aborto en vacas lecheras seropositivas a *N. caninum*. Estos resultados refuerzan la idea de que

existen diferencias entre razas de ganado de carne en cuanto a su susceptibilidad a la infección el aborto por *N. caninum*.

3.8.2. Factores de riesgo asociados al aborto

Presencia de infección: las hembras seropositivas tienen mayor riesgo de abortar que aquellas seronegativas. Diferentes estudios han descrito una asociación significativa entre la presencia de la infección y el aborto, con un riesgo 2 a 3,5 veces superior en las vacas seropositivas que en las seronegativas (Paré *et al.*, 1997; Wouda *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 1999; Stenlund *et al.*, 1999). No obstante, el riesgo de aborto parece disminuir en las gestaciones siguientes a dicho acontecimiento y solo el 4 a 5% de los animales abortan en más de una ocasión (Dubey; Lindsay. 1996; Anderson *et al.*, 1995), produciéndose en la mayoría de los casos el nacimiento de terneros congénitamente infectados. Asimismo, un animal que tiene títulos de anticuerpos elevados posee mayor riesgo de aborto. Una alta seroprevalencia está asociada con un riesgo más elevado de abortos a nivel del rodeo (Dubey *et al.*, 2007). Hobson *et al.*, (2005), reportaron que por cada 1% que se incrementaba la seroprevalencia de *N. caninum* en el rodeo, el riesgo de que se experimentara un aborto relacionado a este parásito se incrementaba un 6%.

Presencia de hospedadores definitivos: existe una asociación positiva entre la presencia de perros y abortos epizooticos asociados a *N. caninum*, debido posiblemente a que éstos serían ocasionados por transmisión horizontal (Bartels *et al.*, 1999; Hobson *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2007). La presentación epidémica de aborto por neosporosis se ha asociado con una posible exposición a los ooquistes del parásito (McAllister *et al.*, 2000; Dijkstra *et al.*, 2002). En aquellas explotaciones con evidencia de transmisión postnatal fue más frecuente la observación de defecaciones caninas en zonas de almacenamiento de comida, así como también el consumo de placentas, fetos abortados o calostro por parte de los perros (Dijkstra *et al.*, 2002).

Abortos previos: se ha observado que vacas infectadas congénitamente que habían abortado con anterioridad, tuvieron mayor riesgo de abortar que vacas infectadas congénitamente que no habían experimentado un aborto antes (Thurmond; Hietala, 1997).

Otras infecciones concomitantes: algunos autores sugieren que la infección por el virus de la diarrea viral bovina (DVB) favorece la manifestación clínica de la neosporosis bovina por la inmunosupresión que ocasiona en el animal facilitando la reactivación de las infecciones latentes o la infección postnatal (Dubey *et al.*, 2007).

Edad: las diferencias encontradas en relación con el riesgo de aborto de los animales y la edad han sido poco sólidas o no son significativas, señalando que la infección se ha diagnosticado en fetos abortados por vacas de edad muy variable (Dubey; Lindsay, 1996). No obstante, el modo de transmisión del parásito también puede influir en el riesgo de aborto en relación con la edad. En casos de abortos epidémicos asociados con la transmisión horizontal no se han observado diferencias significativas entre las tasas de aborto obtenidas en los diferentes grupos de edad de los animales abortados. Aun así, parece que las vacas congénitamente infectadas tienen más probabilidad de abortar en su primera gestación (Thurmond; Hietala, 1997). En otros estudios, también se ha observado que la proporción de infecciones congénitas disminuía según aumentaba el número de partos, posiblemente debido al desarrollo de inmunidad protectora (Thurmond; Hietala, 1997; Wouda *et al.*, 1998; Dijkstra *et al.*, 2003).

3.9. Patogenia

La neosporosis bovina tiene una patogenia compleja en la que influyen múltiples factores dependientes del medio ambiente, hospedador y del parásito. Se trata principalmente una enfermedad de la placenta y del feto, iniciada tras una parasitemia, ya sea como resultado de una infección materna primaria (exógena) o por la recrudescencia durante la gestación de una infección persistente (endógena). (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2002). Tras la ingestión de ooquistes esporulados (Transmisión transplacentaria exógena) (de Marez *et al.*, 1999; Gondim *et al.*, 2004), los esporozoítos son liberados en el intestino delgado, parasitan el epitelio y se transforman en taquizoítos. Estas formas son las responsables de la fase aguda de la infección e iniciarán una etapa de multiplicación rápida en los linfonódulos mesentéricos para luego ser liberados al torrente circulatorio y de esta forma, alcanzar diferentes tejidos (Dubey *et al.*, 2006). Okeoma *et al.*, (2004) demostraron ADN de *N. caninum* en leucocitos sanguíneos de un bovino naturalmente infectado. El resultado de la parasitemia es la diseminación por diferentes tejidos, inclusive útero grávido. Luego se multiplican intracelularmente por endodiogenia, (Dubey; Lindsay, 1996). Experimentalmente la parasitemia ha sido difícil de detectar, debido a la corta y pulsátil duración (Maley *et al.*, 2003; Macaldowie *et al.*, 2004). La severidad de la infección dependerá de la capacidad del taquizoíto para penetrar y multiplicarse en las células y la habilidad del hospedador para inhibir la proliferación del parásito. La multiplicación intracelular del parásito causa la destrucción tisular. Como consecuencia de estos

focos de necrosis, se produce además una reacción inflamatoria con células mononucleares (Buxton *et al.*, 2002).

Con el comienzo del desarrollo de la respuesta inmune del hospedador, los taquizoitos se diferencian en bradizoitos dentro de los quistes tisulares ocasionando una infección persistente (Buxton *et al.*, 2002). Los mecanismos por los cuales los taquizoitos se transforman en bradizoitos y viceversa han sido ampliamente estudiados en *T. gondii* (Lyons *et al.*, 2002). Algunos aislamientos de *N. caninum* pudieron inducir la expresión de antígenos específicos de bradizoitos de forma *in vitro* mediante la aplicación de factores estresantes (pH alcalino, nitroprusiato sódico, condiciones sin CO₂, etc.) (Weiss *et al.*, 1999). Por lo tanto, la diferenciación en bradizoitos puede verse influenciada por la duración del tiempo de cultivo en condiciones de estrés, aunque no con la misma eficiencia que *T. gondii*. Cultivos de tejido neuronal han sido evaluados como un método alternativo para estudiar comportamiento de *N. caninum* en el sistema nervioso central (Vonlaufen *et al.*, 2002), sin embargo la conversión a bradizoitos no fue observada. En otros estudios han descrito a los queratinocitos como una buena alternativa de medio de cultivo para lograr la conversión a bradizoitos cuando se utilizan junto con una tensión continua (Müller *et al.*, 2002), mientras que resultados desalentadores han sido obtenidos cuando se utilizaron otras líneas celulares (Tunev *et al.*, 2002). Siguiendo esta línea, Risco-Castillo *et al.*, (2004) han desarrollado una alternativa simple y ventajosa como método de producción de bradizoitos de *N. caninum*, usando un sistema fiable de cultivo celular (células epiteliales MARC-145) fácil de manejar y con capacidad de purificación del parásito.

Durante la fase crónica de la infección los quistes tisulares con bradizoitos no ocasionan una acción patógena destacada, por lo que el animal no manifiesta ninguna signología. Sin embargo, los bradizoitos alojados en los quistes tisulares del SNC en una hembra gestante pueden reactivarse bajo ciertas influencias hormonales e inmunológicas y transmitir la infección al feto (transmisión transplacentaria endógena). Esta forma de transmisión sería el modo de transmisión más común en bovinos (Björkman *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997). En estos casos, los bradizoitos se liberarían de los quistes transformándose en taquizoitos originando una nueva fase aguda de infección (Quinn *et al.*, 2002). Las causas que provocan la muerte del feto parecen ser multifactoriales y no se conocen con detalle. Dubey y Porterfield (1990) señalaron que la muerte del feto podría ser debida a una miocarditis. Sin embargo, otros autores han postulado que las lesiones en el SNC serían las principales

responsables (Barr *et al.*, 1990). Aun así, en muchas ocasiones no se han encontrado graves lesiones en los órganos vitales por lo que la muerte del feto parece depender también de otros factores. En este sentido, se ha sugerido la importancia de la respuesta inmune celular desarrollada por las hembras gestantes, principalmente durante el periodo inicial de gestación. En la gestación se produce un estado de inmunodepresión concretamente en la placenta, con el fin de evitar el rechazo del feto. Las citoquinas pro-inflamatorias del tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ , TNF- α) que podrían provocar el rechazo del feto están inhibidas y predominan las de tipo Th2 como la IL-10 o el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β). Esta situación beneficiaría la multiplicación del parásito y facilita la destrucción focal de la placenta, tanto materna como fetal, así como el desarrollo de una respuesta inflamatoria. En consecuencia de la multiplicación del parásito se desencadenaría una respuesta Th1 en la madre para controlar la replicación del patógeno, la cual puede ser letal para el feto (Buxton *et al.* 2002; Innes *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2002). Asimismo, se ha sugerido que la muerte fetal podría producirse directamente por la invasión del placentoma por el parásito y el consiguiente daño tisular, interrumpiéndose de esta forma el intercambio de oxígeno y nutrientes. En este sentido, se ha descrito la presencia de lesiones y del parásito en la placenta, tanto en vacas con infección natural (Shivaprasad *et al.*, 1989; Thilsted; Dubey, 1989; Boulton *et al.*, 1995; Bergeron *et al.*, 2001) como experimental (Barr *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 2001). Infecciones experimentales en hembras bovinas preñadas han demostrado que la muerte fetal ocurrió cuando las mismas fueron desafiadas con taquizoitos de *N. caninum* en el día 70 de gestación (Williams *et al.*, 2000; Macaldowie *et al.*, 2004), mientras que el desafío a mediados gestación resultó en la transmisión vertical del parásito sin comprometer la vida del feto (Almería *et al.*, 2011; Bartley *et al.*, 2004). Estas observaciones sugieren que la distribución de la parasitemia durante la gestación es fundamental en las consecuencias clínicas y que lo más probable es que la misma se vea influenciada por la respuesta inmune al parásito tanto materna como fetal. Trabajos realizados por Williams *et al.*, (2000); Collantes-Fernández *et al.*, (2006) y Rosbottom *et al.*, (2007) se apoyan esta conclusión. En un estudio reciente (Bartley *et al.* 2012) se demostró que la generación de una respuesta materna, tanto periférica como local, mediada por células puede inhibir de manera experimental la transmisión vertical del parásito.

A su vez resultados obtenidos tanto en infecciones naturales como experimentales, han demostrado que la edad gestacional determina el desenlace de la infección. En investigaciones realizadas en vacas con infección natural, Dannatt (1997) y Paré *et al.*,

(1997) describieron un aumento en el título de anticuerpos en los meses 5, 6 y 7 de gestación que podría estar relacionado con un mayor estímulo antigénico procedente de la multiplicación del parásito en el feto. Stenlund *et al.*, (1999) estudiaron fluctuaciones de anticuerpos antes, durante y después del parto, observando también un aumento en el título de anticuerpos 4-5 meses antes del parto, que disminuían dos meses después. Por su parte, Quintanilla-Gozalo *et al.*, (2000) y Pereira-Bueno *et al.*, (2000) estudiaron las fluctuaciones de anticuerpos durante la gestación en 32 vacas seropositivas, de las cuales sólo abortaron 10. Se observó un incremento en el título de anticuerpos durante el segundo trimestre, más acusado en las vacas que abortaron y durante el tercer tercio en las vacas que tuvieron terneros congénitamente infectados. Posteriormente, se han realizado observaciones similares; Guy *et al.* (2001) estudiaron la gestación de 9 vacas gestantes crónicamente infectadas. Los valores de anticuerpos observados alcanzaron niveles elevados, unos días antes de producirse la muerte fetal en las vacas que abortaron y entre las semanas 22 y 36 de gestación en las vacas que tuvieron terneros congénitamente infectados. Mientras que las vacas que parieron terneros no infectados, no tuvieron fluctuaciones de anticuerpos durante la gestación.

Por otra parte, los resultados obtenidos en infecciones experimentales han demostrado que en función del periodo de gestación en el que se realice la inoculación del parásito, puede producirse la muerte fetal, el nacimiento de terneros con transmisión congénita o bien el de terneros no infectados. El efecto de la infección antes del comienzo de la gestación ha sido poco estudiado y parece dar lugar al nacimiento de terneros no infectados (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001). Sin embargo la infección durante la primera fase de la gestación suele producir la muerte fetal (Dubey *et al.*, 1992; Barr *et al.*, 1994a; Williams *et al.*, 2000); como ejemplo valga comentar que la inoculación de 6 vacas con taquizoitos por vía intravenosa (i.v) en el día 70 de gestación, causó la muerte de 5 fetos en la semana 13 (Williams *et al.*, 2000). La inoculación de taquizoitos en el segundo tercio de gestación tiene consecuencias variables, produciéndose, en la mayoría de los casos, la infección del feto y no su muerte (Barr *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 2001; Almería *et al.*, 2003; Maley *et al.*, 2003). La inoculación en el último tercio ha dado lugar al nacimiento de terneros congénitamente infectados (Williams *et al.*, 2000). En los terneros congénitamente infectados, las lesiones localizadas en los músculos y en el SNC serían las responsables de los signos neurológicos y neuromusculares observados ocasionalmente (Barr *et al.*, 1991a; Dubey; Bryan *et al.*, 1994). En el animal adulto sólo

se ha observado experimentalmente una respuesta febril y un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos a los pocos días de la inoculación del parásito (Innes *et al.*, 2001; Maley *et al.*, 2001, 2003).

3.10. Signos clínicos

Neospora caninum es la mayor causa de fallas reproductivas en rodeos para carne y leche de diversos países, provocando severas pérdidas económicas (Trees *et al.*, 1999). La infección del feto puede ocasionar: reabsorción, momificación, aborto, nacimiento prematuro y muerte perinatal. Sin embargo, en la mayoría de los casos se produce el nacimiento de un ternero clínicamente sano pero persistentemente infectado. Rara vez, los terneros congénitamente infectados pueden manifestar signología nerviosa variando desde una leve ataxia a tetraparálisis (Moskwa *et al.*, 2007). Las extremidades posteriores y anteriores pueden presentarse flexionadas o hiperextendidas y al examen neurológico puede observarse disminución del reflejo patelar y de la propiocepción (Dubey *et al.*, 2006). Ocasionalmente, pueden producirse defectos congénitos como escoliosis, hidrocefalia o estrechamiento del cordón espinal (O'Toole; Jeffrey, 1987; Barr *et al.*, 1991a; Dubey; Lindsay, 1996).

En cuanto al aborto es la principal manifestación clínica de la neosporosis bovina. La mayor cantidad de abortos ocurren durante la mitad de la gestación. Los fetos que mueren en el útero entre el 3er y el 8vo mes de gestación son usualmente expulsados mostrando moderado grado de autólisis, pero aquellos fetos que mueren antes del 5to mes de gestación pueden momificarse y ser retenidos en el útero por varios meses. Cuando la muerte ocurre en los primeros meses de gestación, puede ocurrir la reabsorción seguida de un nuevo celo (Barr *et al.*, 1991b; Dubey, 2003). Los abortos pueden presentarse en forma endémica o epidémica. En los rodeos con infección endémica se pueden registrar hasta un 10% de abortos que ocurren de un modo esporádico. Mientras que los abortos son definidos como epidémicos si más del 10% o 12,5% de las vacas en riesgo abortan dentro de 6 a 8 semanas (Wouda *et al.*, 1999). Se han registrado brotes de abortos de hasta un 33% en unos pocos meses. A su vez, existen rodeos en los que se han observado estas dos formas simultáneamente (Moskwa *et al.*, 2007). En el caso de Argentina, Moore *et al.*, (2002) realizaron un trabajo epidemiológico de *N. caninum* en ganado para tambo y carne, encontrando lesiones microscópicas compatibles con *N. caninum* en 43 de 188 (22,8 %) fetos y/o placentas evaluadas. A su vez, el protozoo se identificó a través de

inmunohistoquímica en 29 de los 43 casos (67,4 %). Los resultados antes mencionados se observan en la Tabla 2.

Trabajos recientes han estudiado la implicancia de *N. caninum* en abortos de ovejas y cabras. En Nueva Zelanda y Suiza se han registrado casos de aborto por infección natural de *N. caninum* en ovinos (Hässig *et al.*, 2003; West *et al.*, 2006). Por otra parte, abortos en forma reiterada en ovejas infectadas con *N. caninum* se han informado en condiciones de laboratorio y ha sido documentado en una oveja de una granja de Suiza (Jolley *et al.*, 1999; Hässig *et al.*, 2003). En Brasil, se ha descrito la neosporosis congénita en un cabrito con dificultad para incorporarse, ataxia, opistótono y encefalitis no supurativa (Corbellini *et al.*, 2001). Mientras que en Italia se ha hallado *N. caninum*, a través de PCR, en 2 de 23 (8.7 %) fetos abortados (Masala *et al.*, 2007). Por otra parte, anticuerpos contra *N. caninum* se han detectado en cabras de Sri Lanka (Naguleswaran *et al.*, 2004), Argentina (Moore *et al.*, 2007) y Brasil (Faria *et al.*, 2007).

3.11. Bases de la respuesta inmunitaria

La resistencia a parásitos *Apicomplexa* está asociada a una respuesta inmunitaria *T helper 1* (Th1) mediada por linfocitos T CD4 citotóxicos con producción de IFN- γ (interferón gamma), IL-12 (interleuquina 12), FNT- α (factor de necrosis tumoral α) e IgG₂ (inmunoglobulina G₂) (Innes *et al.*, 2001; 2002). La respuesta Th1 desencadenada en respuesta al parásito al comienzo de la preñez genera una serie de procesos inmunopatológicos que son incompatibles con el mantenimiento de la gestación. Por otro lado, en la gestación tardía, cuando la respuesta Th1 es moderada, la lesión en la placenta es menor y el feto sobrevive (Innes *et al.*, 2002). La disminución de la transmisión vertical en las sucesivas preñeces y el bajo nivel de repeticiones de abortos en animales infectados sugieren la existencia de mecanismos inmunitarios adaptativos de protección (McAllister *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2002).

Una de las posibles razones de la reactivación de la infección durante la gestación, estaría dada por el efecto inhibitorio de la progesterona sobre el óxido nítrico, el FNT- α , la activación de las células asesinas naturales ("*natural killer: NK*") y el estímulo de respuesta celular Th2 (Quinn *et al.*, 2002). A su vez, a partir de la mitad de la gestación, la inmunidad mediada por células (IMC) parece modificarse con disminución de la proliferación celular y reducción de la producción de IFN- γ ocasionando la reactivación del quiste tisular de *N. caninum* y la liberación de los bradizoitos. Los mecanismos dependientes de la IMC vuelven a los valores normales

durante el tercer tercio de la gestación existiendo menor riesgo de aborto aunque igualmente puede ocurrir una infección congénita (Dubey *et al.*, 2006).

Las vacas con infección latente que sufren una reactivación a partir del segundo trimestre de la gestación presentan un aumento en el título de los anticuerpos el cual puede disminuir unos meses después del parto. En consecuencia, la determinación del nivel de anticuerpos es considerado como un buen indicador de la actividad parasitaria (Dubey *et al.*, 2007). Por otro lado, el aumento fue mayor en aquellas vacas que parieron un ternero infectado congénitamente y más aún en aquellas que abortaron con respecto de las que parieron un ternero no infectado. Este evento puede estar relacionado a una mayor estimulación antigénica por la multiplicación del parásito en la placenta y feto (Dubey *et al.*, 2006).

3.12. Diagnóstico

Numerosas técnicas son confiables para investigar la infección por *N. caninum* en casos de aborto bovino. Arribar a un diagnóstico confiable de un aborto bovino por *N. caninum* o el rol de la infección en todo el rodeo, puede ser obtenido principalmente examinando fetos abortados y complementariamente por el análisis de anticuerpos del parásito en las madres y sus crías. Para confirmar la situación en un rodeo con relaciona a abortos debidos a *N. caninum* será por lo tanto necesario aplicar una combinación de técnicas de diagnóstico (Tabla 3) (Ortega–Mora *et al.*, 2007). Los tejidos fetales pueden ser examinados histológicamente o el parásito puede ser detectado en forma específica a través de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o por IHQ. La histología detecta lesiones causadas por la infección *N. caninum* en cerebro, corazón e hígado. Estas lesiones son características de infecciones causadas por un protozoo (Wouda *et al.*, 1997). A su vez, existen técnicas específicas que pongan en evidencia la presencia del parásito, como la IHQ y la PCR.

La comparación de técnicas de detección directa para el diagnóstico de *N. caninum* reveló que la sensibilidad de la IHQ tiene limitaciones y se consideró a la PCR como la técnica de diagnóstico de elección para detectar la presencia del parásito (Van Maanen *et al.*, 2004). Esto podría ser importante a la hora del diagnóstico, sin embargo, establecer el diagnóstico de aborto por *N. caninum* es complejo debido a que las infecciones congénitas asintomáticas son habituales y determinar la presencia del parásito o su ADN no implica que el aborto haya sido ocasionado por el protozoo. Por lo tanto es necesario el criterio de un patólogo para poder arribar a un diagnóstico final (Ortega–Mora *et al.*, 2007).

Técnicas de cultivo celular e inoculaciones en animales de experimentación pueden ser utilizadas para aislamiento de *N. caninum* y así poder lograr una mayor multiplicación y caracterización del agente. Pero estos métodos son principalmente utilizados para estudios de investigación y no como técnicas de diagnóstico. Técnicas serológicas, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el inmunoblot, pueden también ser usados para obtener evidencia de la infección por *N. caninum* en fetos abortados para detección de anticuerpos específicos en fluidos fetales. Sin embargo, la detección de anticuerpos está íntimamente relacionada con la edad del feto, ya que en fetos que se encuentran más cercanos al término de la gestación la probabilidad es mucho mayor que en fetos jóvenes (Ortega–Mora *et al.*, 2007). A nivel de rodeo la infección por *N. caninum* puede ponerse en evidencia a través de la detección de anticuerpos anti- *N. caninum* en el suero o la leche de vacas infectadas. Así como también mediante la utilización de técnicas directas como PCR en sangre y semen (Caetano- da- Silva *et al.*, 2004; Okeoma *et al.*, 2004; Ferre *et al.*, 2005), estas técnicas no son realizadas en forma rutinaria debido a la intermitente presencia del parásito en sangre (Ferre *et al.*, 2005).

Por otra parte, técnicas como IFI, microaglutinación, inmunoblot y un considerable número de ELISAs han sido descritos considerablemente. Estas técnicas varían en sus características, cualidades y sus objetivos como prueba. Algunas son optimizadas para la detección de animales seropositivos mientras que otras preferentemente reconocen rodeos que han tenido episodios de aborto por infección con *N. caninum*. Un número de ELISAs han sido también modificados para estudios de avidéz de los anticuerpos encontrados en animales infectados (Björkman *et al.*, 1999; Maley *et al.*, 2001; Schares *et al.*, 2002). A nivel mundial, no existe ningún protocolo estandarizado para su diagnóstico (Dubey *et al.*, 2007). En establecimientos con problemas de abortos, deberían llevarse a cabo la serología materna de vacas abortadas y vacas gestantes del mismo rodeo, así como también el examen de los fetos y de las placentas (Anderson *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2007). El diagnóstico presuntivo de neosporosis en fetos puede considerarse por la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en líquido de cavidades y por las lesiones histológicas. La IHQ usando anticuerpos contra *N. caninum*, es un método efectivo para confirmar la presencia del parásito asociado a las lesiones histopatológicas o la presencia de quistes tisulares (Anderson *et al.*, 2000).

3.13. Pruebas serológicas

Diversas pruebas serológicas tales como IFI (Dubey *et al.*, 1988), el ELISA (Björkman *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 1997), la microaglutinación (Romand *et al.*, 1998) y la APIA (*del término sajón: "applied printing immunoassay"*) (Wilkowsky *et al.*, 2011) han sido utilizadas para demostrar anticuerpos en el suero, leche o en el fluido corporal de los fetos. Para la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum* una amplia variedad de antígenos inmunoreactivos han sido descritos (Barr *et al.*, 1995; Björkman *et al.*, 1997; Jenkins *et al.*, 1997; Marks *et al.*, 1998; Harkins *et al.*, 1998; Packham *et al.*, 1998; Atkinson *et al.*, 2000). Han sido reconocidas por lo menos 20 proteínas de taquizoitos en el rango de los 16 a 80 Kda en *westernblots*, usando anticuerpos policlonales. Los antígenos inmunodominantes fueron detectados como un grupo comprendiendo moléculas con un peso de 16/17, 29/30, 37 y 46 Kda. Los antígenos de 29/30 y 37 Kda son los que se detectan con mayor consistencia por lo que se reconocen como los más importantes para ser utilizados en las pruebas serológicas (Barta *et al.*, 1992; Bjerkas *et al.*, 1994). El antígeno de 29/30 Kda fue asociado con la estructura de gránulos densos, la red tubular y las membranas de las vacuolas parasitóforas, mientras que otro de 17 Kda está asociado con las estructuras del complejo apical conocidas como roptrias. Aunque no existe diferencia en la constitución antigénica de los distintos aislamientos, Atkinson *et al.*, (1999) compararon las propiedades biológicas y genéticas de los aislamientos caninos y bovinos de *N. caninum*, demostrando una marcada diferencia en la patogenicidad y respuesta antigénica entre los distintos aislamientos. Un antígeno de aproximadamente 50 Kda parece ser significativamente más inmunogénico entre los aislamientos caninos comparados con aquellos bovinos.

Los niveles de anticuerpos suelen mantenerse altos durante la gestación en vacas naturalmente infectadas (Jenkins *et al.*, 1997; Stenlund *et al.*, 1999). Sin embargo, en un estudio realizado en Gran Bretaña (Dannatt, 1997) registraron que el 25% de 40 vacas gestantes naturalmente infectadas tuvieron al menos un momento a lo largo de 12 meses que el nivel de anticuerpos estuvo por debajo del límite de detección. Cabe considerar que las fluctuaciones pueden estar influenciadas por el valor de corte utilizado (Jenkins *et al.*, 1997; Dannatt, 1997). Stenlund *et al.*, (1999) ha descrito un aumento del título de anticuerpos en vacas naturalmente infectadas durante 4-5 meses antes del parto y subsecuentemente una caída a los 2 meses posterior al mismo, coincidiendo con otros estudios que describen un aumento similar durante el segundo tercio de gestación (Dannatt, 1997). A su vez también se ha observado (Quintanilla-

Gozalo *et al.*, 2000) que el nivel de anticuerpos es significativamente más elevado durante el segundo tercio de gestación en vacas que abortan en comparación con no abortadas, sugiriendo que el aumento en la concentración de anticuerpos no sería un factor de protección contra el aborto. Según Stenlund *et al.*, (1999) esta cinética en el patrón en los títulos de anticuerpos, que fue consistente en todas las vacas analizadas, puede deberse a una reactivación de *N. caninum* en vacas crónicamente infectadas, más que a una reinfección. En relación a este último punto, se ha observado que la concentración de estrógeno en plasma, orina y heces de vacas sanas aumenta en el 4^{to} y 8^{vo} mes de gestación (Hoffman *et al.*, 1997). Varios estudios sugieren que el aumento de la concentración de estradiol suprime la inmunidad mediada por las células y aumenta la formación de anticuerpos sistémicos a los agentes infecciosos (Styrt; Sugarman, 1991). Por lo tanto, algunos autores sugieren (Stenlund *et al.*, 1999) que el mayor título de anticuerpos durante la gestación podría reflejar una mayor liberación de parásitos por parte de las células de vacas crónicamente infectadas debido una inmunosupresión hormonal. Por otra parte, el aumento de títulos de anticuerpos podría estar reflejando un estímulo antigénico creado por el *N. caninum* en feto infectado.

Estos hallazgos tienen implicancia a nivel diagnóstico ya que se ha sugerido que determinar los niveles de anticuerpos en los animales puede no dar una información definitiva sobre la causa del aborto y que la prueba de una sola muestra de sangre de una vaca aborta a los fines de diagnóstico puede no ser útil, a menos que el nivel de anticuerpos sea excepcionalmente elevado o no sean detectados (Dubey *et al.*, 1997). Una vez que la infección y/o abortos por *N. caninum* fueron identificados en un rodeo, la estimación de la seroprevalencia dentro del mismo y la investigación de los abortos es altamente recomendada (Dubey *et al.*, 2007). Por lo antes mencionado, es esencial conocer la proporción de seropositividad en vacas abortadas y no abortadas para establecer la relación entre la infección con *N. caninum* y los abortos (Dubey *et al.*, 2007), estimando el *odds ratio* (OR), parámetro que indica el riesgo de aborto. De esta manera, un OR mayor a 1 indicaría asociación entre seropositividad y aborto. Para casos de abortos epidémicos se determinaría un OR mayor que en problemas endémicos (Dubey *et al.*, 2007).

3.13.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La prueba de IFI utiliza taquizoitos intactos como antígenos detectando principalmente anticuerpos dirigidos contra antígenos presentes sobre la superficie del

parásito (Björkman *et al.*, 2001) existiendo muy poca reacción cruzada con otros protozoos (*Sarcocystis* spp) (Dubey *et al.*, 1996). A su vez es la prueba de referencia para la estandarización de otras pruebas (Björkman *et al.*, 2001). Para diluciones séricas de 1:25 a 1:640 la sensibilidad y especificidad de la prueba varía de 82.4% a 97% y 85.7% a 90%, respectivamente (Atkinson *et al.*, 2000). En un trabajo (Reichel; Drake, 1996) donde se comparó el diagnóstico de *N. caninum* a través de IFI, ELISA y la histología sugieren como valor de corte para IFI 1:200. De esta forma se obtiene una mayor sensibilidad, teniendo en cuenta que los títulos pueden caer abruptamente tras el aborto. La interpretación de un resultado serológico es difícil por la variación que los niveles de anticuerpos poseen en hembras bovinas gestantes congénitamente infectadas, como ya fue mencionado anteriormente (Dannatt, 1997). También la IFI sirve para detectar anticuerpos en el suero de un ternero sin mamar calostro, o en el líquido de cavidades de un feto abortado, indicando infección con *N. caninum* (Barr *et al.*, 1995), no necesariamente probando que el aborto fue ocasionado por *N. caninum* (Paré *et al.*, 1996).

3.13.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA)

El ELISA ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la neosporosis. La facilidad para procesar un gran número de muestras, una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con la IFI, sumado a la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, hacen confiable esta prueba (Paré *et al.*, 1997). El título de corte o el valor de absorbancia asignado a una prueba es motivo de controversia ya que depende de factores tales como composición del antígeno, anticuerpos identificados y de los conjugados utilizados (Dubey *et al.*, 1997). Un determinado título o valor de corte debería ajustarse a cada circunstancia o situación epidemiológica (Dubey *et al.*, 1999).

3.13.3. ELISA de avidéz

La presencia de anticuerpos a *N. caninum* en el suero indica que un individuo está infectado por el parásito. A su vez, los anticuerpos pueden persistir por largos períodos de tiempo y presentar fluctuaciones a lo largo del tiempo (Jenkins *et al.*, 1997; Stenlund *et al.*, 1999; Sager *et al.*, 2001). Sin embargo los niveles de anticuerpos o el aumento de los títulos no pueden ser usados para estimar si un individuo sufre de neosporosis aguda o crónica. Una de las formas para la identificación de infecciones recientes es midiendo la avidéz que tienen los anticuerpos para unirse con antígenos específicos de *N. caninum*. Esta avidéz es inicialmente limitada pero se incrementa

lentamente a medida que transcurren las semanas siendo este concepto utilizado para diagnosticar infecciones a *T. gondii* (Hedman *et al.*, 1989) y rubéola en humanos (Rousseau; Hedman, 1988) permitiendo distinguir infecciones recientes de infecciones preexistentes, pasadas o viejas.

La prueba de avidéz está basada en el hecho de que el agregado de urea durante el desarrollo del ELISA disocia las uniones débiles de los anticuerpos mientras que los anticuerpos con alta avidéz permanecen firmemente acoplados al antígeno. De esta forma, la prueba permite distinguir infecciones primarias o recientes (con pobre unión Ag-Ac) de las infecciones preexistentes (con fuertes uniones Ag-Ac). Una comparación de ELISAs de avidéz fue realizada por Björkman *et al.*, (2006). Anticuerpos con baja avidéz indicarían una infección reciente y son frecuentemente encontrados en casos de abortos epidémicos como consecuencia de una transmisión horizontal, mientras que la alta avidéz en los anticuerpos puede ser usualmente detectada en animales que han contraído la infección tiempo atrás. Esto implicaría que la alta avidéz de los anticuerpos puede ser resultado de una infección transplacentaria como resultado de una transmisión vertical.

Björkman *et al.*, (1999) trabajando con sueros pareados de terneros experimentalmente infectados con *N. caninum* evidenciaron que la avidéz se incrementó significativamente durante el curso de la infección. La avidéz de los anticuerpos fue estimada por primera vez a las tres semanas de la inoculación inicial, a las 6 semanas los valores de avidéz se ubicaron entre el 21% y el 33% en todos los animales del ensayo. Valores altos de avidéz solo pudieron demostrarse a las 8 semanas post inoculación, confirmando que ello podría utilizarse como un método indirecto para determinar que la respuesta no correspondería a una infección reciente. El uso del ELISA de avidéz contra *N. caninum* en investigaciones de brotes de abortos y partos prematuros en rodeos de bovinos para carne, reveló un incremento en la avidéz promedio específica para anticuerpos IgG entre el día 14 y 85 post-brote de abortos. (McAllister *et al.*, 2000).

3.13.4. Inmunoblot (IB)

El inmunoblot o electrotransferencia, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas de los taquizoitos. Luego son transferidas a una membrana adsorbente, típicamente de nitrocelulosa o de PVDF (polifluoruro de vinilideno) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella (Towbin *et*

al., 1979; Renart *et al.*, 1979). Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas. Como el IB combina la resolución de la electroforesis en gel con la especificidad de detección inmunoquímica, el método tiene una alta especificidad. Sin embargo, es también una técnica engorrosa, consume tiempo y diferentes laboratorios informaron sobre variación en la sensibilidad (Baszler *et al.*, 1996). Mediante inmunoblot se han identificado antígenos inmunodominantes de 17, 29/30, 37 y 46 kDa y proteínas con un peso molecular de 25, 65 y 116 kDa en el suero de bovinos infectados naturalmente (Baszler *et al.*, 1996, Atkinson *et al.*, 2000; Söndgen *et al.*, 2001; Álvarez-García *et al.*, 2002). Sin embargo, el inmunoblot no se ha utilizado como un método habitual de diagnóstico sino como técnica confirmatoria de otras pruebas serológicas (Atkinson *et al.*, 2000; Söndgen *et al.*, 2001). Así, el reconocimiento de tres o cuatro antígenos inmunodominantes de 17, 29/30, 37 y 46 kDa por el suero de vacas infectadas naturalmente se ha considerado como confirmación de la infección (Schaes *et al.*, 1998). En un estudio se demostró una asociación entre los títulos de anticuerpos por IFI y el número de antígenos reconocidos por IB, correspondiendo los mayores títulos de anticuerpos, así como el número de antígenos reconocidos y la intensidad de reconocimiento de los antígenos inmunodominantes, a las vacas abortadas, en comparación con los fetos y los sementales. La fracción antigénica de 17-18 kDa es el mejor marcador de la infección en las tres poblaciones bovinas estudiadas, y está directamente implicado en las fluctuaciones de los títulos de anticuerpos que tienen lugar durante la gestación en las reproductoras infectadas que abortan (Álvarez-García *et al.*, 2002).

3.13.5. Prueba de aglutinación

Esta prueba es muy útil porque no requiere anticuerpos secundarios conjugados, equipamiento para ELISA o microscopio para inmunofluorescencia. Packham *et al.* (1998) desarrollaron un test de aglutinación el cual fue comparado con IFI y ELISA. Muestras de sueros procedentes de 16 especies diferentes de animales cuyos diagnósticos habían sido confirmados histopatológicamente fueron testeadas. La prueba de aglutinación dio una mayor sensibilidad (100%) y especificidad (97%) que la prueba de ELISA (74 y 95%, respectivamente) y tuvo una mayor sensibilidad pero menor especificidad que la IFI (98 y 99%, respectivamente). Lamentablemente esta

prueba no se encuentra actualmente disponible en el mercado comercial de kits diagnósticos.

3.14. Situación de la ganadería en la Provincia de Buenos Aires

Los campos para cría bovina de la provincia de Buenos Aires ocupan dos grandes depresiones: la cuenca del río Salado y la depresión de Laprida (Carrillo, 1997). Ubicada en el centro de la provincia de Buenos Aires, el área de influencia de la cuenca del Salado ocupa una superficie de 6,5 millones de hectáreas, representando un 21% de la superficie de dicha provincia (20 partidos) (Rojas; Vázquez, 2008). La zona dedicada a la cría bovina se caracteriza por ser una llanura muy plana, de escasa pendiente, con desagüe dificultoso o impedido, con suelos muy heterogéneos que presentan como limitaciones más importantes, la baja infiltración, el exceso de la alcalinidad y una napa freática elevada. La precipitación media anual en la misma, oscila entre 800 y 900 mm al norte y aproximadamente 700 mm en la zona sudeste (Carrillo, 1997). La cuenca del Salado aloja más del 20% del stock ganadero nacional y se caracteriza por ser una de las principales regiones de cría bovina de Argentina. Se calcula la presencia de aproximadamente de 8700 productores ganaderos (Censo Nacional Agropecuario, 2002). La identificación en un trabajo previo de tres niveles de estratificación de los productores, según el número de cabezas totales que maneja, permitió comprobar su comportamiento diferencial. Las explotaciones con más de 1000 cabezas representan el 17,9% del total, con el 65,6% de las existencias bovinas totales. El otro extremo están los productores que tienen entre 1- 250 cabezas quienes representa el 45,4% de las explotaciones, concentrando el 7,2% de la existencia total (Rojas; Vázquez, 2008).

Durante los últimos años, la cuenca del Salado pasó de ser una región netamente criadora sino también de recría y engorde de bovinos, y hasta el desarrollo de actividad mixta incluyendo la agricultura. La carga animal se incrementó a partir del año 2003 en un 25%, pasando de los clásicos 0,7 a 1,1 EV/ha ganadera, respectivamente (Vázquez; Rojas 2006), y en el 2007 pasó a 1,54 EV/ha ganadera (Rojas, Vázquez 2009). Algunas de las causas que impulsaron esta intensificación fueron: el aumento de las existencias ganaderas y un cambio en las proporciones de las categorías. Ello ocurrió por un acompañamiento de la adopción de tecnología, sobre todo de la alimentación (suplementación con alimentos energéticos). Pero el principal cambio experimentado por el sector agropecuario en la última década fue sin dudas la expansión de la agricultura por la difusión del cultivo de la soja, el cual vino

acompañado de una demanda de superficie para su siembra pagándose valores de alquileres que no podían competir con la ganadería tradicional. Si bien la cuenca del Salado tiene una superficie agrícola reducida (13,4%), el impacto que generó la expansión de la frontera agrícola sobre los sistemas ganaderos ha sido muy marcado, teniendo en cuenta que las tierras cedidas fueron las de mejor aptitud (Maresca *et al.*, 2011). Para comprender este incremento en el número de cabezas bovinas en la provincia de Buenos Aires, en Marzo del 2014 se registró un total de 17.476.258 de existencias bovinas, representando un incremento del 5,2% comparando con el registrado en Marzo del 2013 (MINIAGRI, 2014). Ante este cambio en los procesos productivos surgieron problemáticas asociadas a diferentes enfermedades metabólicas, infecciosas, parasitarias, fúngicas y tóxicas ocasionando nuevos desafíos para el control, tratamiento y prevención de las mismas (Odriozola, 2009).

3.15. Impacto económico de la infección por *N. caninum*

La principal pérdida económica ocasionada por la neosporosis se debe a los problemas reproductivos, incluyendo pérdidas directas como abortos, natimortos, muertes perinatales, incremento del intervalo parto concepción. Entre las pérdidas indirectas se incluye la asistencia profesional, gastos asociados a establecer el diagnóstico, además de los costos de reposición si las vacas abortadas son eliminadas (Dubey *et al.*, 2007). Asimismo, existen evidencias de disminución en la producción de leche y carne, aunque existe información contradictoria al respecto (Hernández *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2005). Barling *et al.*, (2000) detectaron menor ganancia de peso posdestete, menor peso de la res y menor retorno económico asociado con la detección de anticuerpos contra *N. caninum* en terneros de engorde a corral. No existen datos concluyentes acerca de las pérdidas económicas debidas a la neosporosis bovina pero la importancia de este proceso en la industria ganadera está fuera de toda duda. En California y Holanda, el 20% de los abortos bovinos son causados por *N. caninum*; en Bélgica y Reino Unido alrededor del 12,5% (Davison *et al.*, 1999; De Meerschman *et al.*, (2002); y en España las tasas de participación están entre el 10,7 y el 57%, en dependencia de la técnica diagnóstica utilizada (González *et al.*, 1999; Pereira-Bueno *et al.*, 2003). En California se calculan pérdidas de 35 millones de dólares al año (Dubey, 1999); en Nueva Zelanda y en Australia, donde la infección es responsable de aproximadamente el 25% de los abortos diagnosticados, se considera la causa más importante de pérdidas económicas, con un gasto de 100 millones de dólares australianos anuales (Reichel, 2013). En Canadá se estima que en

una explotación de 50 animales, las pérdidas pueden llegar a ser de 2305 dólares canadienses por año (Chi *et al.*, 2002). Por otra parte, también se deben considerar los costos indirectos asociados al aborto tales como infertilidad, repetición de celo, asistencia veterinaria, gastos de diagnóstico, reposición, posibles pérdidas de producción de leche y compra de ganado en caso de sacrificio. Las pérdidas postnatales debidas a la neosporosis son difíciles de valorar, puesto que en los animales adultos, excluyendo el aborto, la infección es asintomática (Thurmond; Hietala 1997).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Localización del predio

El estudio se llevó a cabo en un establecimiento de cría de la Estación Experimental Agropecuaria Cuenca del Salado del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), ubicado en la ruta provincial 74 km 90,5, (lat. 37° 5´ 7,85" S; long. 57° 52´ 36,45" O), partido de Ayacucho, provincia de Buenos Aires, Argentina. El mismo cuenta con 1600 ha la mayoría de las cuales se destinan a la cría de ganado bovino con escasa superficie de media loma, utilizadas para cultivos forrajeros.

4.2. Duración del ensayo

El ensayo tuvo una duración de 693 días, iniciándose al momento del diagnóstico de preñez en Abril del 2012 y finalizando en Marzo del 2014, momento en el cual se realizó el destete.

4.3. Animales y diseño experimental

4.3.1. Vacas multíparas

Se utilizaron 72 hembras bovinas multíparas de raza Aberdeen Angus (A.A.) negro de cada uno de los tres sistemas a evaluar (intensivo, semi-intensivo y tradicional). Los sistemas tuvieron su origen en abril del 2009; donde en forma aleatoria se distribuyeron 420 bovinos de raza A.A. negro en 3 sistemas diferenciados, principalmente, por la carga animal EV/ha.año y las formas de manejo implementadas. Los mismos se denominaron: intensivo (2 EV/ha.año), semi-intensivo (1,1 EV/ha.año) y tradicional (0,75 EV/ha.año). En la Tabla 4 se resumen las características de carga y manejo de cada uno de los sistemas

En los tres sistemas se realizó un servicio estacionado desde inicio de noviembre a fines de enero. Para el servicio correspondiente al año 2012 y 2013, en los sistemas intensivo y semi-intensivo, se efectuó un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Para el mismo se colocó un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona más una inyección intramuscular de 2 mg de benzoato de estradiol (día 0). El día 8 del tratamiento se retiró el dispositivo, se administraron 0,5 mg de cipionato de estradiol y 500 µg de prostaglandina, ambas vía intramuscular. La IATF se realizó entre las 52 y 54 hs posteriores a la extracción del dispositivo utilizando semen congelado perteneciente a un toro de probada fertilidad. A los 15 días posteriores se

realizó un repaso con toros utilizando un 3% respecto al total de vacas que conformaban los rodeos. El diagnóstico de gestación se realizó por medio de ultrasonografía mediante sonda transrectal lineal (6-8 MHz) a los 65 días de realizada la IATF. En el sistema de manejo tradicional, con el fin de lograr una mayor concentración de partos, se sincronizó el celo a través del uso de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) previo al servicio natural. Se comenzó utilizando un 10% de toros en relación al total de hembras y a medida que el porcentaje de celo disminuía se fue reduciendo su cantidad, hasta alcanzar el 3% que se mantuvo hasta finalizar la temporada de servicio. Todas las drogas utilizadas para ambos protocolos fueron elaboradas por el laboratorio Biogénesis®. Los toros fueron clínicamente aptos para el servicio. Se diagnosticaron libres de campylobacteriosis y tricomonosis genital bovina a partir de dos raspajes prepuciales, con 10 días de intervalo, para análisis de exudado prepucial. El último raspaje coincidió con 2 meses previos al inicio del servicio.

La base forrajera para el sistema intensivo estuvo compuesta por campo natural (37% de la superficie total del sistema), pasturas de festuca (*Festuca arundinacea*) libre de hongo endófito (45%) y avena (*Avena sativa*) (18%) (Foto 1). A su vez tenían acceso a silo de planta entera de maíz administrado como autoconsumo (Foto 2). El sistema semi-intensivo disponía de campo natural (50%) y festuca (50%), sin ensilaje (Foto 3) y por último en el sistema tradicional se pastoreaba siempre sobre campo natural, correspondiendo al 100% de la superficie. En todos los casos, la disponibilidad forrajera era la adecuada para mantener la carga animal preestablecida y sustentar un estado corporal promedio anual de 3 (escala de 1 a 5).

El manejo sanitario fue similar en los tres sistemas. Treinta días previos al inicio del servicio, las vacas fueron inmunizadas con una vacuna inactivada polivalente (CDV®) incluyendo herpes virus bovino tipo 1 y 5, virus de diarrea viral bovina, *Leptospira interrogans* serovares *pomona*, *wolffi*, *hardjo*, *tarassovi*, *icterohaemorrhagiae* y *canicola*, *Campylobacter fetus fetus*, *C. fetus venerealis*, *Histophilus somni*. Al inicio del verano todas las hembras mayores de 8 meses y los toros, fueron vacunados con la cepa Sterne de *Bacillus anthracis* (CDV®). La vacunación contra aftosa se realizó según plan vigente del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria). Durante el último tercio de gestación las vacas fueron inmunizadas contra Rotavirus y Coronavirus bovino, *Salmonella dublin* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (Rotatec J5®). Todas las vacas recibieron una aplicación de Cobre parenteral en el último mes de gestación y tenían acceso a sales de magnesio disponibles en bateas durante los últimos dos tercios de gestación. Los animales

utilizados en el estudio eran libres de Brucelosis y no presentaban antecedentes de fallas reproductivas.

Durante las dos temporadas de servicio, 45 días luego de finalizado el mismo, se realizó el diagnóstico de gestación mediante tacto rectal. Los vientres vacíos al diagnóstico gestacional o con desgaste dentario ($\leq \frac{1}{4}$ diente) fueron retirados del sistema. La reposición se realizó con vientres de segundo servicio que se encontraban preñadas.

4.3.2. Vaquillonas de reposición

Se utilizaron 90 vaquillonas integradas en partes iguales por animales del sistema intensivo (30/90), semi-intensivo (30/90) y tradicional (30/90) las cuales estuvieron agrupadas y recriadas desde los 9 a los 21 meses de edad. El servicio se realizó entre los meses de noviembre a enero a los 15 meses de edad, iniciado por una IATF y luego se realizó un repaso con toros A. A. al 1,5% hasta finalizar el servicio. Durante la recría las vaquillonas se alimentaron en verdeos de avena y fueron suplementadas durante el invierno con grano de maíz grano entero a razón de 3 kg/ animal/día. Al momento del servicio fueron a un potrero de campo natural con especies predominantes de bajo dulce y adecuada disponibilidad forrajera. La carga promedio durante el manejo de recría fue de 1,8 EV/ha. Desde el destete hasta el año de vida se realizó el seguimiento coproparasitológico mediante monitoreo bimensual y en caso de ser necesario se realizó el tratamiento antiparasitario pertinente. Por su parte, las vaquillonas fueron inmunizadas con las mismas vacunas polivalente reproductiva (preservicio) y para el control de la diarrea neonatal según indicaciones del laboratorio elaborador como fue previamente mencionado para las vacas multíparas.

4.3.3. Terneros y terneras

Durante los dos primeros meses (agosto y septiembre) de la temporada de parición del 2013, fueron incluidos al trabajo las terneras y terneros nacidos en cada uno de los sistemas (intensivo, semi-intensivo y tradicional). A partir de los 45 días de vida, todos los terneros fueron vacunados contra enfermedades clostridiales (*Clostridium chauvoei*, *C. perfringens* tipo C y D, *C. septicum*, *C. novy*, *C. sordelli*, (*Clostridium 6*, Agropharma®) dos dosis con 30 días de intervalo. Fueron destetados a los 7 meses de edad en el mes de Marzo del 2014 y las terneras de 6 a 9 meses de edad fueron vacunadas contra brucelosis (Bio-brucelosis®, Biogenesis).

4.4. Manejo de los sistemas

Dos trabajadores rurales estaban encargados de las recorridas diarias de los sistemas. A su vez utilizaban para su trabajo 2 perros machos de 4 y 6 años de edad, respectivamente, los que tenían libre acceso a todos los potreros del establecimiento. La fauna local observada en el establecimiento es la típica de la región de la Pampa Húmeda incluidos la presencia de zorros (*Lycalopex gymnocercus*).

4.5. Cronograma de extracción de sangre

a) Vacas

A partir de Abril del 2012 hasta Enero del 2014, se extrajeron muestras de sangre en 8 momentos, con un intervalo promedio de 80 días (Tabla 5). Durante los muestreos 0 al 4 (día 0 y 358 respectivamente), los sueros de 72 vacas multíparas de cada uno de los tres sistemas fueron analizados en forma consecutiva. A partir del muestreo 4 (día 358), el número de animales se vio reducido debido al retiro de vientres a causa del desgaste dentario y/o falta de preñez al momento del diagnóstico de gestación. Por lo tanto, durante los muestreos 5, 6 y 7 (días 442, 497 y 627 respectivamente), el número de vacas multíparas en las cuales se logró el seguimiento continuo fue de 65, 68 y 67 para el sistema intensivo, semi-intensivo y tradicional, respectivamente. En cada ocasión se obtuvieron 5ml de sangre por punción de la vena coccígea.

b) Vaquillonas

Con similar metodología, se extrajeron muestras de sangre (5ml) a las 90 vaquillonas de reposición en 6 oportunidades con un intervalo promedio de 70 días durante 403 días, desde junio del 2012 hasta julio del 2013 (Tabla 6).

c) Terneros

Durante los meses de agosto y septiembre del 2013 se extrajeron muestras de sangre de 34, 20 y 24 terneros/as de los sistemas intensivo, semi-intensivo y tradicional, respectivamente, previo a la ingestión de calostro. Para tal procedimiento se contó con la colaboración de dos profesionales y dos trabajadores rurales divididos en dos grupos. Se realizaban recorridas diarias, a pie, a caballo o en vehículo, dependiendo de las condiciones climáticas, con intervalo de 2 hs promedio, desde las 7:00 hs. hasta las 19:00 hs. Al observar vientres con signos de parto inminente o

pariendo, se esperaba un tiempo prudencial al ternero recién parido (Foto 4) el cual era inmovilizado mediante una manea sujetando patas y manos y se identificaba con una caravana plástica numerada en la oreja derecha. Una vez realizadas las maniobras anteriores, y con la ayuda de una persona que sujetaba la cabeza del animal, se ingurgitaba la vena yugular con una banda de goma, se desinfectaba la zona con alcohol y se recolectaban 5 ml de sangre con aguja de 18G y jeringa plástica de 12 ml. Las muestras de sangre se colocaron en tubos plásticos transparentes para serología con interior siliconado, activador de coágulo y tapón siliconado hemorrepeleante. Luego de 24hs y tras una centrifugación durante 10 minutos a 3000 rpm, se extrajo el suero el cual se almacenó en tubos ependorff y se mantuvieron a -20°C hasta su análisis. Mediante la prueba de la gamma-glutamil transferasa (GGT) se validó la calidad del calostro (Magalhães *et al.*, 2014; Davison *et al.*, 1999; Paré *et al.*, 1996). La no ingesta de calostro se consideró cuando la concentración de GGT fue ≤ 50 UI/L. Aquellos terneros/as que habían sido evaluados al momento previo de ingerir calostro fueron reevaluados, a través de la toma de una muestra de sangre, a los 7 meses de edad tiempo en el cual fueron destetados.

4.6. Antígeno para la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se utilizaron taquizoitos completos de la cepa NC-1 de *N. caninum* los que se multiplicaron en células VERO en medio RPMI-1640 (SIGMA, St. Louis, EE.UU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), N-2-hidroxietilpiperazina-N´2 sulfonato de etanol (HEPES), L-glutamina (10 μ g/ml), penicilina-estreptomina (10 μ g/ml) y anfotericina B (20 μ g/ml), mantenidas en atmósfera con 5% de CO₂. A partir de la inoculación con taquizoitos, la monocapa de células se mantuvo en medio suplementado conteniendo 2% de SFB. A las 24 a 48 hs previas de efectuarse la cosecha de taquizoitos, el medio de cultivo era descartado sustituyéndoselo por medio sin SFB. Los taquizoitos fueron cosechados durante su fase intracelular cuando un 80% de las células de la monocapa estuvieron infectadas. Las células fueron desprendidas mediante un raspador estéril y la suspensión de células conteniendo los protozoos fue recolectada en tubos para centrifuga efectuándose un lavado en una solución salina tamponada estéril (SSTE) (Andrianarivo *et al.*, 1999). El material recolectado fue pasado en condiciones de esterilidad a través de jeringas y agujas de 21 a 27G de diámetro para liberar los taquizoitos intracelulares. Este material fue centrifugado a 1350xg durante 15 minutos eliminándose el sobrenadante y resuspendiéndose nuevamente en SSTE. Luego se realizó el recuento de taquizoitos

en cámara de Neubauer por duplicado. Finalmente, el número de taquizoitos fue ajustado a una concentración de $4,7 \times 10^7$ taquizoitos/ml en un volumen final de 3 ml de SSTE.

4.7. Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Se utilizaron portaobjetos especiales para IFI de 15 hoyuelos (Multitest slides, ICN, MP Biomedicals; Ohio, USA) a los cuales se les aplicó 10 μ l de la suspensión de taquizoitos ajustada a la concentración de 1×10^7 protozoos/ml de SSTE en cada hoyuelo recolectando el exceso de antígeno hasta obtener una película húmeda. Los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente y se fijaron en metanol durante 1 minuto almacenándose a -20° C hasta su utilización. Todas las muestras de suero obtenidas fueron analizadas por la prueba de IFI para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* (Conrad *et al.*, 1993; Yamane *et al.*, 1997). Se utilizó una dilución de suero $\geq 1/200$ para las vacas multíparas, vaquillonas y terneros/as a los 7 meses de edad (Dubey *et al.*, 1996) y para los sueros de los terneros/as, previo a la ingestión de calostro, $\geq 1:25$ (Kyaw *et al.*, 2005). A partir de las muestras positivas se realizaron diluciones hasta título final.

4.8. ELISA de avidéz.

La avidéz que tuvieron los anticuerpos para unirse con los antígenos específicos de *N. caninum* permitió distinguir infecciones primarias o recientes de infecciones preexistentes. Se estimó el porcentaje de avidéz de 5, 4 y 8 vacas seropositivas de los sistemas intensivo, semi-intensivo y tradicional, respectivamente. La avidéz de los anticuerpos fue evaluada utilizando una prueba de ELISA comercial (CIVTEST BOVIS NEOSPORA[®] HIPRA, España). Para estimar la avidéz de los anticuerpos séricos se utilizó un agente desnaturizante que debilitó la interacción antígeno/anticuerpo (Ag/Ac), presente en la formulación de la solución astringente provista por el elaborador. De este modo, utilizando los reactivos del kit, se valoró en paralelo la muestra de suero bovino en presencia y ausencia de la solución astringente. El valor de la absorbancia de los pocillos tratados con dicha solución, comparado con el valor obtenido en los no tratados, fue una medida del “efecto de lavado” de la solución astringente sobre las IgG anti-*N. caninum* presentes en el suero. En las condiciones utilizadas, solo las interacciones de avidéz baja o media fueron “lavadas” con la solución astringente, mientras que las soluciones de alta avidéz resistieron al tratamiento. Para la interpretación de los resultados se utilizó el porcentaje del índice

relativo (IRPC) sugerido por el elaborador del producto. La siguiente fórmula fue utilizada para obtener el IRPC correspondiente a cada uno de los sueros analizados.

$$\text{IRPC} = \frac{\text{DO 405 Muestra} \frac{1}{100} - \text{DO 405 Control (-)} \times 100}{\text{DO 405 Control (+)} - \text{DO 405 Control (-)}}$$

Los resultados fueron interpretados utilizando la escala descrita por el elaborador de la prueba:

Resultado	Valor IRPC
Positivo ++++	> 100
Positivo +++	50 < IRPC < 100
Positivo ++	25 < IRPC < 50
Positivo +	5 < IRPC < 25
Negativo	≤ 5.0

Cuando el valor del IRPC de las muestras fue >5.0 tuvo sentido el cálculo de la avidéz y se estableció posteriormente el valor Rz utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{RZ} = \frac{\text{DO 405 Muestra} \frac{1}{25} - \text{DO 405} \frac{1}{100}}{\text{DO 405 Control (+)} - \text{DO 405 Muestra} \frac{1}{100}}$$

Los resultados fueron interpretados de acuerdo a la siguiente valoración:

Valor Rz	Avidéz del suero
Menor o igual a 1,0	Alta (A)
Mayor de 1,0 y menor a 2,0	Intermedia (I)
Mayor o igual a 2,0	Baja (B)

4.9. Análisis de los datos

4.9.1. Criterios para establecer la seroprevalencia en vacas multíparas

La seroprevalencia se estableció a partir del número de animales seropositivos a la IFI con un título $\geq 1:200$ sobre el total de animales muestreados de cada sistema en cada uno de los momentos analizados.

4.9.2. Incidencia acumulada (IA)

Se determinó el número o proporción de animales que resultaron seropositivos a la IFI con un título $\geq 1:200$, tras 627 días de seguimiento, en cada sistema.

4.9.3. Riesgo relativo (RR)

Se calculó el riesgo relativo como el cociente entre la incidencia acumulada en el grupo con el valor mas alto y la incidencia acumulada en el grupo de referencia, dando como resultado un índice de asociación.

4.9.4. Transmisión horizontal

La frecuencia de transmisión horizontal fue estimada a través de dos formas:

I) El número de vaquillonas y vacas que cambiaron su estado serológico, pasando de ser negativas a positivas a *N. caninum* durante el período de estudio, para cada uno de los 3 sistemas analizados.

II) El porcentaje de terneros que resultaron serológicamente negativos a *N. caninum* en el muestreo precalostrado y que luego resultaron seropositivos a los 7 meses de edad.

4.9.5. Transmisión vertical

La frecuencia de transmisión vertical fue estimada por el número de terneros que resultaron seropositivos, previo a la ingestión de calostro, nacidos de hembras seropositivas. Para ello se estableció la siguiente fórmula:

Terneros seropositivos previa ingestión de calostro/ vientres seropositivos x 100 (Moré *et al.*, 2009)

4.9.6. Diagnóstico serológico de neosporosis en caninos

Se realizó una IFI con una dilución a título final para detectar la presencia de IgG anti- *N. caninum* en los dos caninos presentes en el establecimiento. El análisis fue realizado en el laboratorio de inmunoparasitología de la Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Veterinarias (gentileza de la Dra. María Cecilia Venturini y sus colaboradores).

4.9.7. Análisis estadístico:

Los resultados de prevalencia obtenidos en cada momento y en cada uno de los sistemas fueron analizados a través de tabla de contingencia con un $p < 0,05$ (Proc Freq/SAS®). La concentración de anticuerpos durante la gestación, en relación al sistema, grupo y momento analizado, fue evaluado a través de ANVA y el test de medias LSD con un $p < 0,05$ /GLIMMIX Proc, SAS. Como medida de asociación, para las frecuencias de riesgo entre animales expuestos y no expuestos, se utilizó el riesgo relativo o razón de las tasas de incidencia con un intervalo de confianza a un nivel de 95%. La prueba de Chi cuadrado fue utilizada para la significancia estadística. Los datos fueron obtenidos a través de: EPIDAT v. 3.1 ®.

5. RESULTADOS

5.1. Seroprevalencia a *N. caninum* en las vacas

En total se analizaron 1680 muestras de suero por IFI correspondientes a vacas multíparas. Los resultados de la serología individual de aquellos vientres que presentaron anticuerpos anti-*N. caninum*, en algún momento a lo largo del trabajo, se detallan en la Tabla 8. Durante el estudio, 5 (7,8%), 4 (6,0%) y 8 (12,7%) vacas multíparas, correspondientes al sistema intensivo, semi-intensivo y tradicional respectivamente, fueron seropositivas en alguno de los momentos analizados (Tabla 7). Los resultados reflejaron que no existieron diferencias significativas ($p>0,05$) en la seroprevalencia a *N. caninum* entre los sistemas de cría analizados en ninguno de los momentos. A su vez, tampoco existieron diferencias significativas en la seroprevalencia existente en cada sistema de manejo a lo largo del período de estudio (21 meses). No se detectaron vaquillonas de reposición positivas a *N. caninum* a través de la IFI, en ninguno de los sistemas estudiados. Sin embargo 2, 2 y 1 vaquillona correspondientes al sistema intensivo, semi-intensivo y tradicional, respectivamente, presentaron títulos <200 en algún momento del estudio (Tablas 12, 13 y 14). Para el caso de las vaquillonas del sistema intensivo los títulos fueron de 1:25 para ambas, en el sistema semi-intensivo los títulos fueron de 1:100 y 1:50, mientras que la vaquillona del sistema tradicional presentó un título de 1:25.

5.2. Incidencia acumulada (IA)

La incidencia acumulada en vacas multíparas del sistema intensivo, semi-intensivo y tradicional fue de 0,083; 0,063 y 0,145 respectivamente (Tabla 9). Los resultados reflejaron que no existieron diferencias significativas (Proced Freq/SAS $p>0,05$).

5.3. Riesgo relativo (RR)

El RR a *N. caninum* en vacas multíparas del sistema intensivo, semi-intensivo y tradicional fue de 1,33, 1,00 y 2,30, respectivamente (Tabla 10).

5.4. Cinética de respuesta de anticuerpos durante la gestación

Se observó una variación en el título de anticuerpos contra *N. caninum* en los vientres seropositivos durante la gestación (Figura 1). Durante el 2do y 3er tercio de

gestación los títulos fueron significativamente más elevados que durante el momento del servicio ($p < 0,0001$) y el 1er tercio de gestación ($p: 0,01$).

5.5. Prueba de Aidez

El resultado de la aidez se presenta en la Tabla 11. De la misma surge que en los tres sistemas en estudio, la gran mayoría (76% 13/17) de los vientres seropositivos analizados tenían anticuerpos de alta e intermedia aidez, demostrando que la infección estaba presente previo al inicio del trabajo. Por el contrario, un porcentaje menor de animales en los tres sistemas, habría adquirido la enfermedad a lo largo del trabajo, indicando transmisión horizontal reciente. A su vez esta herramienta de diagnóstico utilizada permitió corroborar los resultados que surgen de la evaluación de la transmisión horizontal y vertical como se indican a continuación.

5.6. Evaluación de la transmisión horizontal

A lo largo del estudio 4, 2 y 4 vacas seronegativas inicialmente correspondientes al sistema intensivo, semi-intensivo y tradicional, respectivamente, seroconvirtieron, demostrando posiblemente una infección reciente.

Todas las vaquillonas de reposición resultaron seronegativas a lo largo del trabajo.

Todos los terneros sangrados al precalostrado que fueron seronegativos al nacimiento se mantuvieron negativos a los 7 meses de edad, en todos los sistemas del presente trabajo, siendo la tasa de transmisión horizontal 0%.

5.7. Evaluación de la transmisión vertical

Se sangraron 34, 20 y 24 terneros de madres de los sistemas intensivo, semi-intensivo y tradicional, respectivamente, previo a la ingestión de calostro. Todos los terneros tuvieron valores de GGT \leq a 50 UI/L, confirmando que no ingirieron calostro previo al muestreo.

Un total 32, 18 y 23 terneros nacidos de madres seronegativas resultaron seronegativos al momento del sangrado precalostrado.

En el sistema intensivo, 2 vacas seropositivas parieron terneros con la misma condición serológica. En el sistema semi-intensivo solo una de dos vacas seropositivas parió un ternero seropositivo, mientras que en el sistema tradicional una vaca

seropositiva parió un ternero seropositivo. Dicha información confirma que la transmisión vertical fue del 100% para el sistema intensivo y tradicional y de 50% para el sistema semi-intensivo. Los títulos de anticuerpos de los terneros positivos al precalostrado fueron variables (1:400 a 1:3200). Un ternero seropositivo del sistema intensivo murió a las 48hs de haber nacido por causas que no se pudieron establecer. Este animal nació débil, con dificultad para incorporarse y con 14kg de P.V. en un sistema donde el peso promedio al parto fue de 26 kg. de P.V. A su vez todas las vacas que parieron terneros seropositivos inclusive la vaca del sistema semi-intensivo que parió un ternero seronegativo presentaron valores de alta e intermedia avidéz.

5.9. Diagnóstico serológico de neosporosis en caninos

Ambos perros utilizados para tareas rurales en el establecimiento resultaron ser positivos a la presencia de anticuerpos anti- *N. caninum* en una dilución de 1:800 a IFI.

6. DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la frecuencia de transmisión horizontal y vertical de *N. caninum* en tres niveles de intensificación para la cría bovina en la región de la cuenca del Salado. Los resultados del mismo evidenciaron la presencia de bovinos seropositivos a *N. caninum* en los tres sistemas estudiados, sin embargo indicaron que la transmisión no se incrementó a medida que el sistema se intensificó, rechazándose la hipótesis inicial.

La presencia de animales positivos a *N. caninum* en los tres sistemas analizados (5, 4 y 8 vacas multíparas seropositivas en el sistema intensivo, semi-intensivo y tradicional, respectivamente) concuerda parcialmente con lo descrito por Moore *et al.*, (2002) y Fort *et al.*, (2015). Quienes describieron que más del 50% y 80% de los rodeos para carne de la región pampeana poseen al menos un animal positivo a *N. caninum*. Estos valores también coinciden con valores internacionales (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1999).

Durante el transcurso de este trabajo los valores de seroprevalencia oscilaron entre 0 a 6,1%, 2,8 a 4,4% y 1,5 a 9,7% con un valor promedio de 3,0%, 3,6%, y 5,6% para el sistema intensivo, semi-intensivo y tradicional, respectivamente. En Argentina, Moore *et al.* (2002), reportaron una seroprevalencia de 4,7% en 9 rodeos de bovinos para carne sin antecedentes de pérdidas reproductivas. A su vez, Fort *et al.*, (2015) en la provincia de La Pampa, detectó un 7% de seroprevalencia. Estos resultados encuentran similitud, sin embargo deben compararse con cautela ya que utilizaron diferentes técnicas serológicas, punto de corte, diseño y tamaño del muestreo.

Como se desprende de los resultados de la seroprevalencia en vacas multíparas a lo largo de 21 meses (Tabla 7) obtenidos en este trabajo, otra importante variable a tener en cuenta sería el momento de obtención de la muestra de sangre para análisis serológico. El momento del muestreo a lo largo de la gestación debe ser considerado a la hora de presentar y discutir los resultados serológicos, ya que durante el transcurso del presente estudio se observó una variación en la seroprevalencia de cada uno de los sistemas. Los resultados de este trabajo mostraron un incremento de los títulos de anticuerpos a *N. caninum* durante el segundo y tercer trimestre de gestación. Este incremento en los niveles de anticuerpos durante la mitad y final de la gestación ha sido reportado por otros autores (Dannatt, 1997; Stenlund *et al.*, 1999; Pereira-Bueno *et al.*, 2000; Guy *et al.*, 2001). La fluctuación de anticuerpos podría estar relacionada probablemente con la recrudescencia de la infección por *N. caninum* en animales gestantes crónicamente infectados en relación a un desequilibrio entre el sistema

inmunológico del hospedador y el parásito. Esta fluctuación en los títulos de anticuerpos es el mayor problema en la identificación de animales seropositivos crónicamente infectados (Stenlund *et al.*, 1999; Maley *et al.*, 2001). Por lo observado en este trabajo, en un servicio estacionado (noviembre, diciembre, enero), durante el 2do tercio y 3er tercio de gestación los títulos fueron significativamente más elevados que durante el momento del servicio y el 1er tercio de gestación. Por lo tanto, se concluye que durante el 2do y 3er tercio de gestación sería el momento ideal para la detección de animales positivos a *N. caninum*, y muestreando en otro momento podríamos estar subestimando la real seroprevalencia en el rodeo. Esta fluctuación debería ser considerada en estudios transversales donde pueden no detectarse todos los animales infectados, a diferencia de este tipo de estudios longitudinales.

Los niveles de seroprevalencia en el presente trabajo no tuvieron diferencias significativas entre los sistemas analizados, así como tampoco lo tuvieron dentro de cada sistema, en los momentos evaluados. Hay que tener en cuenta que los tres sistemas fueron establecidos en Abril del 2009 y que el inicio de este trabajo se remonta a Abril del 2012, por lo tanto al momento de comenzar el presente estudio los sistemas tenían 3 años de antigüedad. Si bien estos resultados sugieren que no existieron factores asociados entre el uso de tecnologías que tiendan a un mayor nivel de intensificación en la producción de bovinos para carne y un aumento en la transmisión de *N. caninum* en el periodo de estudio, el mismo debería tomarse con cautela en base al número de los animales que componían los respectivos sistemas y al tiempo de antigüedad de conformación de los sistemas. Otro dato importante en el análisis es el hecho de que el trabajo se llevó adelante en el mismo predio (mismos perros, agua y fauna). Incluso, la tendencia fue la opuesta, tanto la seroprevalencia como el riesgo relativo fueron superiores en el manejo extensivo (tradicional). A diferencia con este resultado, Fort *et al.*, (2015) observó que los rodeos para carne que se encontraban en regiones con manejo más intensivo (centro y este de la provincia de La Pampa), tenían mayor riesgo de infección por *N. caninum* en comparación con rodeos extensivos del oeste pampeano. Debe tenerse en cuenta que muchos de estos establecimientos donde yacen estos rodeos pueden poseer mayor antigüedad en la forma de manejo que lo que se observa en este trabajo experimental. A su vez, estas diferencias detectadas fueron asociadas a medidas de manejo de rodeos más intensificados como el aumento de la carga animal y la suplementación nutricional, en coincidencia con lo hallado por Barling *et al.*, (2001). Sin embargo, es importante considerar que los trabajos mencionados no aclaran la carga instantánea

(n° de animales por superficie por día). En establecimientos con mayor grado de intensificación es frecuente el manejo de pasturas y verdeos con alta carga instantánea, lo que conlleva a una serie de ventajas con respecto al aprovechamiento del recurso forrajero pero también a algunas limitaciones sanitarias que se hacen más importantes al aumentar la escala de la explotación en que se aplica. Una de las desventajas de este tipo de práctica es la mayor tasa de transmisión de enfermedades infectocontagiosas y posiblemente una mayor exposición a ooquistes de *N. caninum* eliminados por hospedadores definitivos. La defecación de los perros utilizados para el trabajo rural en relación a los comederos, depósitos de alimento o silos de maíz para consumo, ha sido considerado un factor de riesgo de transmisión horizontal (Dijkstra *et al.*, 2002). En el presente estudio, a pesar de que los rodeos presentaban diferentes valores de carga animal, ningún sistema fue sometido a manejos con alta carga instantánea.

Como se mencionó anteriormente, la ausencia de un mayor riesgo de transmisión asociado a una mayor intensificación de la cría bovina en el presente estudio, también pudo ser debido a que los animales conformaban, en un primer momento, un único sistema, el cual fue dividido, posteriormente, para la conformación de los sistemas intensivo, semi-intensivo y tradicional tres años previos al inicio de este trabajo. A su vez, el periodo de tiempo y las condiciones climáticas en el cual se desarrolló el estudio (21 meses) pudieron no haber sido condicionantes para detectar diferencias significativas entre los grupos analizados. Al respecto Sanderson *et al.*, (2000), en un estudio realizado en EE.UU. relacionaron la seroprevalencia de los rodeos para cría bovina y los factores de riesgo de infección, encontrando que uno de los mejores predictores de seroprevalencia fue el lugar de residencia del rodeo. Según los autores, la dispersión geográfica de la prevalencia puede ser debido a diferencias climáticas o puede reflejar la distribución de la densidad de otros hospedadores definitivos no reconocidos. En este estudio los dos perros adultos utilizados para el laboreo diario resultaron ser seropositivos a *N. caninum* indicando una infección previa y una potencial eliminación pasada de ooquistes. Sin embargo, el hecho de que fuese perro adultos, tendría menor riesgo que la introducción de nuevas camadas de cachorros (Gondim *et al.*, 2002). Es pertinente considerar que hasta el momento no existen trabajos realizados en rodeos para carne que encuentren una asociación entre la presencia de perros en explotaciones ganaderas y el riesgo de infección (Von Blumröder *et al.*, 2006). Una posible explicación para esto es que en el tipo de manejo menos intensivo en explotaciones de ganado vacuno para carne, en general, no

genera una estrecha relación entre los excrementos de los perros y el ganado (Barling *et al.*, 2001; Otranto *et al.*, 2003; Sánchez *et al.*, 2003). Por otra parte, Barling *et al.*, (2001) observaron que la presencia de perros en explotaciones de ganado vacuno para carne podría ser un supuesto factor de protección.

En el presente trabajo no se hallaron vaquillonas de recría positivas a *N. caninum*. Sin embargo, durante los meses de agosto y septiembre en la temporada de parición del 2013, fueron detectados terneros/as seropositivos al nacer en cada uno de los sistemas, al igual que en los rodeos de vacas múltiparas. Esto haría suponer que para el caso de vaquillonas, crónicamente infectadas, los niveles de anticuerpos bajan a niveles indetectables probablemente por la escasa estimulación del sistema inmune en el periodo pre-púber y antes de la primera gestación. A su vez en un trabajo realizado por Yao *et al.*, (2009) donde se compara la identificación de animales infectados por *N. caninum* a través de PCR y ELISA, hallaron animales seronegativos que a su vez contenían ADN de *N. caninum*. Los autores sugieren que existen diferentes explicaciones para estas conclusiones, en primer lugar, los casos PCR-positivos sin anticuerpos específicos a *N. caninum* podrían deberse a una fase inicial de la infección, y que la muestra de sangre recogida sea antes de que se produzca el desarrollo de anticuerpos. En segundo lugar, la sensibilidad de la prueba ELISA depende del valor de corte utilizado como criterio de infección en la prueba. En este sentido, los animales con bajos niveles de anticuerpos pueden ser negativos en las pruebas de ELISA debido a la baja sensibilidad de la prueba. En tercer lugar, puede ocurrir una seroconversión en bovinos infectados con *N. caninum*. Por último, debería considerarse que también es posible que algunos animales pueden ser inmunotolerantes a *N. caninum*. La gestación es un periodo en donde ocurre reactivación del parásito desde los sitios de latencia como ya ha sido ampliamente demostrado (Guy *et al.*, 2001, Innes *et al.* 2002; Moore *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que la transmisión congénita es la más frecuente (Gottstein *et al.*, 1998; Wouda *et al.*, 1999; López-Gatius *et al.*, 2004), al existir un porcentaje de seroprevalencia acumulada bajo en los tres sistemas (5,5 a 9,7%), la probabilidad de seleccionar al azar una ternera nacida congénitamente infectada, para futura reposición, disminuye. Solo dos vaquillonas del sistema intensivo, una del semi-intensivo y dos del sistema tradicional, presentaron títulos <1:200, indicando exposición a *N. caninum* (Tabla 12, 13 y 14).

El porcentaje de transmisión vertical en este estudio fue similar a lo descrito por otros autores (Davison *et al.*, 1999; Paré *et al.*, 1996; Schares *et al.*, 1998; Wouda *et*

al., 1998). A su vez, uno de los terneros seropositivos del sistema intensivo murió a las 48hs post parto, luego de sufrir debilidad y tras haber nacido con un peso vivo de 14 kg. Sin embargo, debido a la falta de toma de muestras por el avanzado grado de autólisis, no se logró arribar a un diagnóstico definitivo. Según lo observado por otros autores (De Meerschman *et al.*, 2005) estos signos clínicos serían compatibles con la neosporosis congénita en animales naturalmente infectados. Por otro lado, mientras que no se observó infección post natal en los terneros y vaquillonas la transmisión horizontal en el rodeo de vacas multíparas fue baja. Solo un número muy bajo de animales de los tres sistemas convirtieron su estado inicial de negativo a positivo. Sin embargo es posible creer, en base a lo observado a lo largo de este trabajo, que las fluctuaciones observadas en los anticuerpos, incluso por debajo del título de corte, a lo largo del tiempo, conlleven posiblemente a malinterpretar el resultado de la transmisión horizontal. En relación a este punto y teniendo en cuenta que a través de la avidéz es posible diferenciar una infección reciente de una crónica, solo 4 animales de los 10 considerados positivos a partir de una transmisión horizontal, resultaron tener baja avidéz. A su vez, esta baja frecuencia de transmisión horizontal en tres sistemas para cría bovina (5,5% semi-intensivo y 2,8% para el intensivo y tradicional) coincide con otros trabajos quienes reportaron tasas de 4,5% (Bartels *et al.*, 2007) y 1,9% (Davison *et al.*, 1999) usando diferentes técnicas de ELISA y considerando que estos últimos realizaron sus estudios en animales de tambo. A su vez, Magalhães *et al.*, (2014), en un trabajo donde evaluaron las rutas de transmisión de *N. caninum* en vacas de tambo del noreste de Brasil, encontraron una baja proporción de transmisión horizontal la cual fue de 3,1%. Por otro lado, Moré *et al.*, (2009) en Argentina reportaron tasas de transmisión vertical mucho más elevadas (51% y 47%) quienes adjudicaron estas discrepancias, en relación a otros autores (Bartels *et al.*, 2007; Davison *et al.*, 1999) a los métodos de diagnóstico utilizados, al valor de corte y a que en los establecimiento para tambo en Argentina cuentan con otras condiciones de manejo así como también con un mayor número de perros presentes en los establecimientos. Lamentablemente es difícil comparar los datos de transmisión horizontal en ganado para carne debido a la falta de información sobre este aspecto.

La avidéz específica de los anticuerpos IgG ha sido utilizada para reflejar la persistencia de la infección por *N. caninum* en bovinos (Björkman *et al.*, 1999). El incremento de la avidéz durante el curso de la infección indica cronicidad de la infección (Björkman *et al.*, 1999). En el presente trabajo la avidéz de la IgG sérica de animales positivos por IFI y ELISA resultó ser, en más del 75% de los animales que

conformaban los tres sistemas (intensivo, semi-intensivo y tradicional), intermedia y alta. Esto indicaría que la infección ya estaba presente al inicio del trabajo y por lo tanto tendría un curso crónico. La ausencia de abortos en animales infectados podría estar relacionada a este suceso. En relación a este último punto Björkman *et al.*, (2003) observaron que vacas abortadas tenían baja avidéz en comparación con vacas que habían parido terneros normalmente. Este resultado implica que rodeos que adquirieron la infección hace tiempo, tienen una mayor inmunidad protectora contra *N. caninum* y una mayor capacidad de prevenir el aborto durante la exposición del parásito en comparación de animales expuestos por primera vez. Un número menor de animales en los tres sistemas tuvieron baja avidéz ($\leq 25\%$ de los positivos) siendo en todos los casos animales que adquirieron la infección a lo largo del trabajo. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no todos los animales que sufrieron una posible infección reciente tuvieron baja avidéz. La avidéz de los anticuerpos también puso en evidencia que todas las vacas positivas a la infección por *N. caninum*, de los sistemas intensivo, semi-intensivo y tradicional, que parieron terneros seropositivos y la vaca del sistema semi-intensivo que parió un ternero seronegativo presentaban alta e intermedia avidéz, lo cual hace suponer de una transmisión transplacentaria endógena para todos los casos evaluados.

7. CONCLUSIONES

Las frecuencia de transmisión horizontal de *N. caninum*, en este estudio fue de 2,8% para el sistema semi-intensivo y 5,5%, para el intensivo y el tradicional, respectivamente. Mientras que la transmisión vertical fue del 100%, para el sistema intensivo y tradicional y de 50% para el sistema semi-intensivo. Los resultados fueron similares en tres niveles de intensificación diferentes para cría bovina en la región de la cuenca del Salado, Buenos Aires, Argentina. La baja proporción de transmisión horizontal combinada con la alta proporción de transmisión vertical, en los tres sistemas analizados, permiten concluir que la transmisión transplacentaria es la principal ruta de infección de *Neospora caninum* en los sistemas analizados.

Las condiciones de manejo y ambiente proporcionadas a medida que se intensificó el sistema de cría bovina en el presente estudio, no fueron los suficientemente determinantes para incrementar la frecuencia de transmisión de *N. caninum*.

Finalmente se rechaza la hipótesis propuesta para este trabajo siendo necesario futuros estudios con rodeos formados por un mayor número de animales con seguimientos prolongados en el tiempo que permitan evidenciar los posibles efectos de los factores de riesgo para validar la información obtenida en el presente trabajo y esclarecer la relevancia reproductiva de la neosporosis bovina en ganado para carne de la pampa húmeda.

8. BIBLIOGRAFÍA

ALMERIA, S., ARAUJO, R.N., DARWICH, L., DUBEY, J.P., GASBARRE, L.C. 2011. Cytokine gene expression at the materno-foetal interface after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 33(9): 517-23.

ALMERIA, S., DE MAREZ, T., DAWSON, H., ARAUJO, R., DUBEY, J.P., GASBARRE, L.C. 2003. Cytokine gene expression in dams and fetuses after experimental *Neospora caninum* infection of heifers at 110 days of gestation. *Parasite Immunol.* 25(7): 383-392.

ALVAREZ-GARCIA, G., PEREIRA-BUENO, J., GOMEZ-BAUTISTA, M., ORTEGA-MORA, L.M. 2002. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Vet Parasitol.* 107(1): 15-27.

ALVES NETO, A.F., BANDINI, L.A., NISHI, S.M., SOARES, R.M., DRIEMEIER, D., ANTONIASSI, N.A., GENNARI, S.M. 2011. Viability of sporulated oocysts of *Neospora caninum* after exposure to different physical and chemical treatments. *J Parasitol.* 97(1): 135-139.

ANDERSON, M.L., ANDRIANARIVO A.G., CONRAD P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci.* 60-61: 417-431.

ANDERSON, M.L., REYNOLDS, J.P., ROWE, J.D., SVERLOW, K.W., PACKHAM, A.E., BARR, B.C., CONRAD. P.A. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 210: 1169-1172.

ANDERSON, M.L., PALMER, C.W., THURMOND, M.C., PICANSO, J.P., BLANCHARD, P.C., BREITMEYER, R.E., KINDE, H.A. 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J Am Vet Med Assoc.* 207(9): 1206-1210.

ANDRIANARIVO, A.G., CHOROMANSKI, L., MCDONOUGH, S.P., PACKHAM, A.E., CONRAD, P.A. 1999. Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *Int J Parasitol.* 29(10): 1613-1625.

ARMENGOL, R., PABÓN, M., SANTOLARIA, P., CABEZÓN, O., ADELANTADO, C., YÁNIZ, J., ALMERÍA, S. 2007. Low seroprevalence of *Neospora caninum* infection associated with the leucosis breed in cow-calf herds in Andorra, Europe. *J Parasitol.* 93(5): 1029-1032.

ATKINSON, R., HARPER, P.A.W., REICHEL, M. P., ELLIS, J.T. 2000. Progress in the Serodiagnosis of *Neospora caninum* Infections of Cattle. *Parasitol Today.* 16(3): 110-114.

ATKINSON, R., HARPER, P.A.W., RYCE, C., MORRISON, D.A., ELLIS, J.T. 1999. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology.* 118(04): 363-370.

BAE, J.S., KIM, D.Y., HWANG, W. S., KIM, J.H., LEE, N.S., NAM, H.W. 2000. Detection of IgG antibody against *Neospora caninum* in cattle in Korea. *Korean J Parasitol.* 38(4): 245-249.

BARLING, K.S., MCNEILL, J.W., PASCHAL, J.C., McCOLLUM, F.T., CRAIG, T.M., ADAMS, L.G., THOMPSON, J.A. 2001. Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Prev Vet Med.* 52(1): 53-61.

BARLING, K.S., MCNEILL, J.W., THOMPSON, J.A., PASCHAL, J.C., McCOLLUM, F.T., CRAIG, T.M., ADAMS, L.G. 2000. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J Am Vet Med Assoc.* 217(9): 1356-1360.

BARR BC, ROWE JD, SVERLOW KW, 1994, Experimental reproduction of bovine fetal *Neospora* infection and death with a bovine *Neospora* isolate. *J Vet Diagn Invest.* 6: 207–215

BARR, B.C., CONRAD, P.A., DUBEY, J.P., ANDERSON M. L. 1991a. *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J Vet Diagn Invest.* 3: 39-46.

BARR, B.C., ANDERSON, M.L., SVERLOW, K.W., CONRAD, P.A. 1995. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. *Vet Rec.* 137(24): 611-613.

BARR, B.C., ANDERSON, M.L., DUBEY, J.P., CONRAD P.A. 1991b. *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet Pathol.* 28, 110-116.

BARR, B.C., ANDERSON, M.L., WOODS, L.W., DUBEY, J.P., CONRAD. P.A. 1992. *Neospora*-like protozoal infections associated with abortion in goats. *J Vet Diagn Invest.* 4: 365-367.

BARTA, J.R., DUBEY, J.P. 1992. Characterization of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by Western blot analysis and immunoelectron microscopy. *Parasitol Res.* 78(8): 689-694.

BARTELS, C.J., HUIJINK, I., BEIBOER, M.L., VAN SCHAIK, G., WOUDA, W., DIJKSTRA, T., STEGEMAN, A. 2007. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. *Vet Parasitol.* 148(2): 83-92.

BARTELS, C.J., WOUDA, W., SCHUKKEN, Y.H. 1999. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology.* 52: 247-257.

BARTELS, C.J.M., ARNAIZ-SECO, J.I., RUIZ-SANTA-QUITERA, A., BJÖRKMAN, C., FRÖSSLING, J., VON BLUMRÖDER, D., ORTEGA-MORA, L.M. 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet Parasitol.* 137(1): 17-27.

BARTLEY, P.M., KIRVAR, E., WRIGHT, S., SWALES, C., ESTEBAN-REDONDO, I., BUXTON, D., INNES, E.A. 2004. Maternal and fetal immune responses of cattle inoculated with *Neospora caninum* at mid-gestation. *J Comp Pathol.* 130(2): 81-91.

BARTLEY, P.M., WRIGHT, S.E., MALEY, S.W., MACALDOWIE, C.N., NATH, M., HAMILTON, C.M. INNES, E.A. 2012. Maternal and foetal immune responses of cattle following an experimental challenge with *Neospora caninum* at day 70 of gestation. *Vet Res.* 43: 38.

BASSO, W., SCHARES, S., MINKE, L., BÄRWALD, A., MAKSIMOV, A., PETERS, M., SCHARES, G. 2010. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum* associated bovine abortion. *Vet Parasitol.* 173(1): 24-31.

BASSO, W.,L., VENTURINI, M.C., VENTURINI, D.E., KWOK, O.C. SHEN, S.K., DUBEY, J.P. 2001. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. J Parasitol. 87: 612-618.

BASZLER, T.V., KNOWLES, D.P., DUBEY, J.P., GAY, J.M., MATHISON, B.A., McELWAIN, T.F. 1996. Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 34(6): 1423-1428.

BERGERON, N., GIRARD, C., PARÉ, J., FECTEAU, G., ROBINSON, J., BAILLARGEON, P. 2001. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. J Vet Diagn Invest. 13(2): 173-175.

BJERKAS, I., DUBEY, J.P. 1991. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. Acta Vet Scand. 32: 407-410.

BJERKAS, I., JENKINS, M.C., DUBEY, J.P. 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1: 214-221.

BJERKAS, I., MOHN, S.F. PRESTHUS. J. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z Parasitenkd. 70:271-274.

BJÖRKMAN, C., ALENIUS, S., MANUELSSON, U., UGGLA, A. 2000. *Neospora caninum* and bovine virus diarrhoea virus infections in Swedish dairy cows in relation to abortion. Vet J. 159: 201-206.

BJÖRKMAN, C., HOLMDAHL, O.J. UGGLA, A. 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. Vet Parasitol. 68: 251-260.

BJÖRKMAN, C., McALLISTER, M.M., FRÖSSLING, J., NÄSLUND, K., LEUNG, F., UGGLA, A. 2003. Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. J Vet Diagn Invest. 15(1): 3-7.

BJÖRKMAN, C., NÄSLUND, K., STENLUND, S., MALEY, S. W., BUXTON, D., UGGLA, A. 1999. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. J Vet Diagn Invest. 11(1): 41-44.

BOULTON, J.G., GILL, P.A. COOK, R.W. FRASER, G.C. HARPER, P.A., DUBEY, J.P. 1995. Bovine *Neospora* abortion in north-eastern New South Wales. Aust Vet J. 72: 119-120.

BRYAN, L.A., GAJADHAR, A.A., DUBEY, J.P., HAINES, D.M. 1994. Bovine neonatal encephalomyelitis associated with a *Neospora* sp. protozoan. Can Vet J. 35(2): 111.

BUXTON, D., McALLISTER, M.M., DUBEY, J.P. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. Trends Parasitol. 18: 546-552.

BUXTON, D., MALEY, S.W., WRIGHT, S., THOMSON, K.M., RAE, A.G., INNES, E.A. 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. J Comp Pathol. 118: 267-279.

CAETANO-DA-SILVA, A., FERRE, I., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., NAVARRO, V., ADURIZ, G., UGARTE-GARAGALZA, C., ORTEGA-MORA, L. M. 2004. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. Theriogenology. 62(7): 1329-1336.

CAMPERO, C.M., MOORE, D.P., ODEÓN, A.C., CIPOLLA, A.L., ODRIOZOLA, E. 2003. Aetiology of bovine abortion in Argentina. Vet Res Commun. 27(5): 359-369.

CARRILLO, J. 1997. Manejo de un rodeo de cría. 2^{da} edición Editorial INTA Centro Regional Buenos Aires Sur. Pp. 1-8.

CEDILLO, C.J.R., MARTÍNEZ, M.J.J., SANTACRUZ, A.M., BANDA, R.V.M., MORALES, S.E. 2008. Models for experimental infection of dogs fed with tissue from fetuses and neonatal cattle naturally infected with *Neospora caninum*. Vet Parasitol. 154(1): 151-155.

CHI, J., VANLEEUEWEN, J.A., WEERSINK, A., KEEFE, G. P. 2002. Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leucosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. Prev Vet Med. 55(2): 137-153.

COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ARNAIZ-SECO, I., BURGOS, B.M., RODRIGUEZ-BERTOS, A., ADURIZ, G., FERNANDEZ-GARCIA, A., ORTEGA-MORA, L.M. 2006.

Comparison of *Neospora caninum* distribution, parasite loads and lesions between epidemic and endemic bovine abortion cases. *Vet Parasitol.* 142(1): 187-191.

CONRAD, P.A., SVERLOW, K., ANDERSON, M., ROWE, J., BONDURANT, R., TUTER, G., BREITMEYER, R., PALMER, C., THURMOND, M., ARDANS, A. 1993. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn Invest.* 5: 572-578.

CORBELLINI, L.G., COLODEL, E.M., DRIEMEIER, D. 2001. Granulomatous encephalitis in a neurologically impaired goat kid associated with degeneration of *Neospora caninum* tissue cysts. *J Vet Diagn Invest.* 13(5): 416-419.

CORBELLINI, L.G., SMITH, D.R., PESCADOR, C.A., SCHMITZ, M., CORREA, A., STEFFEN, D.J., DRIEMEIER, D. 2006. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev Vet Med.* 74(2): 130-141.

DANNATT, L. 1997. *Neospora caninum* antibody levels in an endemically-infected dairy herd (Reprinted from *Cattle Practice*, vol 5, 1997. *Irish Vet J.* 51(4): 200-201.

DAVISON, H.C., GUY, C.S., MCGARRY, J.W., GUY, F., WILLIAMS, D.J., KELLY, D.F., TREES, A.J. 2001. Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res Vet Sci.* 70: 163-168.

DAVISON, H.C., OTTER, A., TREES, A.J. 1999. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 29(10): 1683-1689.

DE MAREZ, T., LIDDELL, S., DUBEY, J.P., JENKINS, M.C., GASBARRE, L. 1999. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. *Int J Parasitol.* 29: 1647-1657.

DE MEERSCHMAN, F., SPEYBROECK, N., BERKVEN, D., RETTIGNER, C., FOCANT, C., LECLIPTEUX, T., LOSSON, B. 2002. Fetal infection with *Neospora caninum* in dairy and beef cattle in Belgium. *Theriogenology.* 58(5): 933-945.

DE MEERSCHMAN, F., FOCANT, C., CASSART, D. 2005. Clinical, pathological and diagnostic aspects of congenital neosporosis in a series of naturally infected calves. *Vet Rec.* 157(4): 115-118.

DEREGIBUS V.A., CAUHÉPE M.A. 1983. Pastizales naturales de la depresión del Salado: Utilización basada en conceptos ecológicos. Revista de investigaciones agropecuarias INTA. Volumen XVIII, N°1: 47.

DIJKSTRA, T., BARKEMA, H.W., EYSKER, M., BEIBOER, M.L., WOUDA. W. 2003. Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. Vet Parasitol. 110: 161-169.

DIJKSTRA, T., BARKEMA, H.W., HESSELINK, J.W., WOUDA. W. 2002. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. Vet Parasitol. 105: 89-98.

DIJKSTRA, T., EYSKER, M., SCHARES, G., CONRATHS, F.J., WOUDA, W., BARKEMA, H.W. 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. Int J Parasitol. 31: 747-752.

DUBEY J.P., BUXTON D., WOUDA W. 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. J Comp Pathol. 134: 267-289.

DUBEY J.P., SCHARES G., ORTEGA-MORA L.M. 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 20: 323-367.

DUBEY J.P., LINDSAY, D.S., ADAMS, D.S., GAY, J.M., BASZLER, T.V., BLAGBURN, B.L., THULLIEZ P. 1996. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. Am J Vet Res. 57: 329-336.

DUBEY, J.P., LAHUNTA. A.D. 1993. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. Appl Parasitol. 34: 229-233.

DUBEY, J.P., HILL, D.E., LINDSAY, D.S., JENKINS, M.C., UGGLA, A., SPEER C.A. 2002. *Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms. Trends Parasitol. 18: 66-69.

DUBEY, J.P. 1999. Recent advances in *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol. 84: 349-367.

DUBEY, J.P. 2003. Neosporosis in cattle. J Parasitol. 89 (Suppl): S42-S56.

DUBEY, J.P. 2004. Toxoplasmosis a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol.* 126(1): 57-72.

DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 67: 1-59.

DUBEY, J.P., CARPENTER, J.L., SPEER, C.A., TOPPER, M.J., UGGLA, A. 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 192: 1269-1285.

DUBEY, J.P., JENKINS, M.C., RAJENDRAN, C., MISKA, K., FERREIRA, L.R., MARTINS, J., CHOUDHARY, S. 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 181 (2): 382-387.

DUBEY, J.P., PORTERFIELD, M.L. 1990 . *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *J Parasitol.* 76 (05): 732-734.

DUBEY, J.P., SCHARES, G. 2011. Neosporosis in animal the last five years. *Vet Parasitol.* 180(1): 90-108.

ELENI, C., CROTTI, S., MANUALI, E., COSTARELLI, S., FILIPPINI, G., MOSCATI, L., MAGNINO, S. 2004. Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus. *Vet Parasitol.* 123(3): 271-274.

FARIA, E.B., GENNARI, S.M., PENA, H.F., ATHAYDE, A.C.R., SILVA, M.L.C., AZEVEDO, S.S. 2007. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. *Vet Parasitol.* 149(1): 126-129.

FERRE, I., ADURIZ, G., DEL-POZO, I., REGIDOR-CERRILLO, J., ATXAERANDIO, R., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ORTEGA-MORA, L.M. 2005. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. *Theriogenology.* 63(5): 1504-1518.

FIORETTI D., PASQUALI P., DIAFERIA M., MANGILI V., ROSIGNOLI, L. 2003. *Neospora caninum* infection and congenital transmission: serological and parasitological study of cows up to the fourth gestation. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 50: 399-404.

FORT M.; EDELSTEN M.; MALEY S.; INNES E. 2015. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina. *Acta Parasitol.* 60(2): 000–000; ISSN 1230-2821.

FRENCH N.P.; CLANCY, D.; DAVISON, H.C.; TREES, A.J. 1999. Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle. *Int J Parasitol.* 29 (10): 1691-1704.

GARCÍA-ISPIERTO I., LÓPEZ-GATIUS F., SANTOLARIA, P. YÁNIZ, J. NOGAREDA C., PABÓN M., LÓPEZ-BÉJAR, M. ALMERÍA S. 2005. The use of Limousine bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora* seropositive dairy cows. *Wiad Parazytol.* 51: 42-43

GONDIM, L.F., McALLISTER, M.M., PITT, W.C., ZEMLICKA, D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of (*Neospora caninum*). *Int J Parasitol.* 34 (2): 159-161.

GONDIM, L.F.P., GAO, L., McALLISTER, M.M. 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. *J Parasitol.* 88(6): 1159-1163.

GONZÁLEZ, L., BUXTON, D., ATXAERANDIO, R., ADURIZ, G., MALEY, S., MARCO, J.C., CUERVO, L.A. 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet Rec.* 144(6): 145-150.

GUY, C.S., WILLIAMS, D.J.L., KELLY, D.F., McGARRY, J.W., GUY, F., BJÖRKMAN, C., SMITH, R.F., TREES, A.J. 2001. *Neospora caninum* in persistently infected, pregnant cows: spontaneous transplacental infection is associated with an acute increase in maternal antibody. *Vet Rec.* 149: 443-449.

GOTTSTEIN, B., HENTRICH, B., WYSS, R., THÜR, B., BUSATO, A., STÄRK, K. D. C., MÜLLER, N. 1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int J Parasitol.* 28(4): 679-691.

HARKINS, D., CLEMENTS, D.N., MALEY, S., MARKS, J., WRIGHT, S., ESTEBAN, I., BUXTON, D. 1998. Western blot analysis of the IgG responses of ruminants infected with *Neospora caninum* and with *Toxoplasma gondii*. *J Comp Pathol.* 119(1): 45-55.

HÄSSIG, M., SAGER, H., REITT, K., ZIEGLER, D., STRABEL, D., GOTTSTEIN, B. 2003. *Neospora caninum* in sheep: a herd case report. *Vet Parasitol.* 117(3): 213-220.

HEDMAN, K., LAPPALAINEN, M., SEPPÄIÄ, I., MÄKELÄ, O. 1989. Recent primary *Toxoplasma* infection indicated by a low avidity of specific IgG. *J Infect Dis.* 159(4): 736-740.

HEMPHILL, A., FUCHSA, N., SONDA, S., HEHLB, A. 1999. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 29: 1175-1188.

HERNÁNDEZ, J., RISCO, C., DONOVAN, A. 2001. Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J Am Vet Med Assoc.* 219(5): 632-635.

HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int J Parasitol.* 29(10): 1669-1676.

HOBSON, J.C., DUFFIELD, T.F., KELTON, D., LISSEMORE, K., HIETALA, S.K., LESLIE, K.E., PEREGRINE, A.S. 2005. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Vet Parasitol.* 127(3): 177-188.

HOFFMANN, B., GOES, D.P.T., SCHULER, G. 1996. Determination of free and conjugated oestrogens in peripheral blood plasma, feces and urine of cattle throughout pregnancy. *Experimental and clinical endocrinology y diabetes: official journal, German Society of Endocrinology and German Diabetes Association,* 105(5): 296-303.

HORNOK, S., EDELHOFER, R., HAJTÓS, I. 2006. Seroprevalence of neosporosis in beef and dairy cattle breeds in Northeast Hungary. *Acta Vet Hung.* 54(4): 485-491.

INNES, E.A., ANDRIANARIVO, A.G., BJÖRKMAN, C., WILLIAMS, D.J., CONRAD P.A. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol.* 18: 497-504.

INNES, E.A., WRIGHT, S.E. MALEY, S., RAE, A., SCHOCK, A., KIRVAR, E. BARTLEY, P., HAMILTON, C., CAREY, I.M., BUXTON, D. 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 31: 1523-1534.

JARDINE, J.E. 1996. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet Parasitol.* 62: 231-240.

JENKINS, M.C., WOUDA, W., DUBEY, J.P. 1997. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. *Clin Diagn Lab Immunol.* 4(3): 270-274.

JENSEN, A.M., BJÖRKMAN, C., KJELDEN, A.M., WEDDERKOPP, A., WILLADSEN, C., UGGLA, A., LIND, P. 1999. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev Vet Med.* 40(3): 151-163.

JOLLEY, W.R., McALLISTER, M.M., McGUIRE, A.M., WILLS, R.A. 1999. Repetitive abortion in *Neospora*-infected ewes. *Vet Parasitol.* 82(3): 251-257.

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*. *Int J Parasitol.* 40(8): 945-950.

KUL, O., ATMACA, H.T., ANTEPLIOGLU, T., OCAL, N., CANPOLAT, S. 2015. *Neospora caninum*: the First Demonstration of the Enteroepithelial Stages in the Intestines of a Naturally Infected Dog. *J Comp Pathol.* 153(1): 9-13.

KYAW, T., SUWIMONTEERABUTR, J., VIRAKUL, P., LOHACHIT, C., KALPRAVIDH, W. 2005. Seronegative conversion in four *Neospora caninum*-infected cows, with a low rate of transplacental transmission. *Vet Parasitol.* 131(1): 145-150.

LÓPEZ-GATIUS, F., PABÓN, M., ALMERIA, S. 2004. *Neospora caninum* infection does not affect early pregnancy in dairy cattle. *Theriogenology.* 62(3): 606-613.

LÓPEZ - GATIUS, F., SANTOLARIA, P., YÁNIZ, J.L., GARBAYO, J.M., ALMERÍA, S. 2005. The Use of Beef Bull Semen Reduced the Risk of Abortion in *Neospora*-seropositive Dairy Cows. *J Vet Med. Series B,* 52(2): 88-92.

LYONS, R.E., MCLEOD, R., ROBERTS, C.W. 2002. *Toxoplasma gondii* tachyzoite–bradyzoite interconversion. *Trends Parasitol.* 18(5): 198-201.

MACALDOWIE, C., MALEY, S. W., WRIGHT, S., BARTLEY, P., ESTEBAN-REDONDO, I., BUXTON, D., INNES, E.A. 2004. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. J Comp Pathol. 131(2): 142-156.

MAGALHÃES, V.C.S.D., OLIVEIRA, U.V.D., COSTA, S.C.L., SANTOS, I.D.A., PEREIRA, M.J.S., MUNHOZ, A.D. 2014. Transmission paths of *Neospora caninum* in a dairy herd of crossbred cattle in the northeast of Brazil. Vet Parasitol. 202(3): 257-264.

MALEY, S.W, BUXTON, D., THOMSON, K.M., SCHRIEFER, C.S., INNE, E.A. 2001. Serological analysis of calves experimentally infected with *Neospora caninum*: a 1-year study. Vet Parasitol. 96: 1-9.

MALEY, S.W., BUXTON, D., RAE, A.G., WRIGHT, S.E., SCHOCK, A., BARTLEY, P.M., INNES, E.A. 2003. The pathogenesis of neosporosis in pregnant cattle: inoculation at mid-gestation. J Comp Pathol. 129(2): 186-195.

MARESCA, S., QUIROZ GARCÍA, J., PLORUTTI, F. 2011. Eficiencia reproductiva en rodeos de cría de la Cuenca del Salado. Ediciones INTA, Centro Regional Buenos Aires Sur, Pág. 7–8

MARKS, J., LUNDÉN, A., HARKINS, D., INNES, E. 1998. Identification of *Neospora* antigens recognized by CD4+ T cells and immune sera from experimentally infected cattle. Parasite Immunol. 20(7): 303-309.

MASALA, G., PORCU, R., DAGA, C., DENTI, S., CANU, G., PATTA, C., TOLA, S. 2007. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by PCR. J Vet Diagn Invest. 19(1): 96-98.

McALLISTER, M.M., BJÖRKMAN, C. ANDERSON-SPRECHER, R. ROGERS. D.G. 2000. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. J Am Vet Med Assoc. 217: 881-887.

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*. Int J Parasitol. 28: 1473-1478.

McGARRY, J.W., STOCKTON, C.M. WILLIAMS, D.J. TREES, A.J. 2003. Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. J Parasitol. 89: 628-630.

MINIAGRI 2014. Existencias de Ganado bovino en Argentina. [en línea]. <http://www.minagri.gob.ar/site/ganaderia/bovinos/index.php>. [consulta: 04 Octubre 2014]

MOORE, D., REICHEL, M., SPATH, E., CAMPERO, C. 2013. *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. Trop Anim Health Prod. 45 (5): 1237-1241.

MOORE, D.P., CAMPERO, C.M., ODEÓN, A.C., POSSO, M.A., CANO, D., LEUNDA, M.R., SPÄTH, E. 2002. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. Vet Parasitol.107(4): 303-316.

MOORE, D.P., DE YANIZ, M.G., ODEÓN, A.C., CANO, D., LEUNDA, M.R., SPÄTH, E.A.J., CAMPERO, C.M. 2007. Serological evidence of *Neospora caninum* infections in goats from La Rioja Province, Argentina. Small Ruminant Res. 73(1): 256-258.

MOORE, D.P., LEUNDA, M.R., ZAMORANO, P.I., ODEÓN, A.C., ROMERA, S.A., CANO, A., CAMPERO, C.M. 2005. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. Vet Parasitol.130(1): 29-39.

MOORE, D.P., PÉREZ, A., AGLIANO, S., BRACE, M., CANTÓN, G., CANO, D., CAMPERO, C.M. 2009. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. Vet Parasitol.161 (1): 122-125.

MORÉ, G., BACIGALUPE, D., BASSO, W., RAMBEAUD, M., BELTRAME, F., RAMIREZ, B., VENTURINI, L. 2009. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. Vet Parasitol.160(1): 51-54.

MOSKWA, B., CABAJ, W., PASTUSIAK, K., BIEN, J. 2003. The suitability of milk in detection of *Neospora caninum* infection in cows. Acta Parasitol. 48. 138–141

MOSKWA, B., PASTUSIAK, K., BIEN, J., CABAJ, W. 2007. The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows. Parasitol Res. 100(3): 633-636.

MÜLLER, N., VONLAUFEN, N., GIANINAZZI, C., LEIB, S.L., HEMPHILL, A. 2002. Application of real-time fluorescent PCR for quantitative assessment of *Neospora caninum* infections in organotypic slice cultures of rat central nervous system tissue. J Clin Microbiol. 40(1): 252-255.

NAGULESWARAN, A., HEMPHILL, A., RAJAPAKSE, R.P.V.J., SAGER, H. 2004. Elaboration of a crude antigen ELISA for serodiagnosis of caprine neosporosis: validation of the test by detection of *Neospora caninum*-specific antibodies in goats from Sri Lanka. Vet Parasitol.126(3): 257-262.

O'TOOLE, D., JEFFREY, M. 1987. Congenital sporozoan encephalomyelitis in a calf Vet Rec. 121: 563–566

ODRIOZOLA, E. 2009. Problemas sanitarios en bovinos vinculados a la intensificación ganadera. Jornada técnica sobre sanidad animal y nutrición mineral en recursos forrajeros (23 de octubre de 2009, Azul, Argentina).

OKEOMA, C.M., WILLIAMSON, N.B., POMROY, W.E., STOWELL, K.M., GILLESPIE, L. 2004. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. Vet Parasitol.122(4): 307-315.

ORTEGA-MORA, L.M., FERRE, I., DEL POZO, I., CAETANO-DA-SILVA, A., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., REGIDOR-CERRILLO, J., UGARTE-GARAGALZA, C., ADURIZ, G. 2003. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. Vet Parasitol. 117: 301-308.

ORTEGA-MORA, L.M., GOTTSEIN, F.J., CONRATHS, F.J., BUXTON, D. (Ed.). 2007. Protozoal abortion in farm ruminants: guidelines for diagnosis and control. © CAB International.

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. Vet Parasitol. 110(1): 17-23.

OTRANTO, D., LLAZARI, A., TESTINI, G., TRAVERSA, D., DI REGALBONO, A.F., BADAN, M., CAPELLI, G. 2003. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. Vet Parasitol.118(1): 7-18.

OULD-AMROUCHE, A., KLEIN, F., OSDOIT, C., MOHAMMED, H.O., TOURATIER, A., SANAA, M., MIALOT, J.P. 1999. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet Res.* 30(5): 531-538.

PABÓN, M., LÓPEZ-GATIUS, F., GARCÍA-ISPIERTO, I., BECH-SÀBAT, G., NOGAREDA, C., ALMERÍA, S. 2007. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: A 3-year study. *Vet Parasitol.* 147(1): 40-46.

PACKHAM, A., SVERLOW, K., CONRAD, P., LOOMIS, E., ROWE, J., ANDERSON, M., MARSH, A., CRAY, C., BARR, B. 1998. A modified agglutination test for *Neospora caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 5: 467-473.

PARÉ, J., THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol.* 83: 82-87.

PARÉ, J., THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. *Can J Vet Res.* 60: 133-139.

PARÉ, J., HIETALA, S.K., THURMOND, M.C. 1995. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 7: 352-359

PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., PÉREZ-PÉREZ, V., ESPI-FELGUEROSO, A., ALVAREZ-GARCIA, G., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ORTEGA-MORA, L.M. 2003. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. *Vet Parasitol.* 111(2): 143-152.

PEREIRA-BUENO, J., QUINTANILLA-GOZALO, A., SEIJAS-CARBALLEDO, A., COSTAS, E., ORTEGA-MORA, L.M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations. *Int. J Parasitol.* 30, 906-909.

PETERS, M., LUTKEFELS, 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. *Int J Parasitol.* 31: 1144-1148.

PUSTERLA, N., CONRAD, P.A., PACKHAM, A.E., MAPES, S.M., FINNO, C.J., GARDNER, I.A., WILSON, W.D. 2011. Endogenous transplacental transmission of *Neospora hughesi* in naturally infected horses. *J Parasitol.* 97(2): 281-285.

QUINN, H.E., ELLIS, J.T., SMITH, N.C. 2002. *Neospora caninum*: a cause of immune-mediated failure of pregnancy? *Trends Parasitol.* 18: 391-394.

QUINTANILLA-GOZALO, A., PEREIRA-BUENO, J., SEIJAS-CARBALLEDO, A., COSTAS, E., ORTEGA-MORA, L.M. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *Int J Parasitol.* 30: 900-906.

QUINTANILLA-GOZALO, A., PEREIRA-BUENO, J., TABARES, E., INNES, E.A., GONZALEZ-PANIELLO, R., ORTEGA-MORA, L.M. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int J Parasitol.* 29(8): 1201-1208.

REICHEL, M.P., DRAKE, J.M. 1996. The diagnosis of *Neospora* abortions in cattle. *N Z Vet J.* 44(4): 151-154.

REICHEL, M.P., ALEJANDRA AYANEGUI-ALCÉRRECA, M., GONDIM, L.F., ELLIS, J.T. 2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle—The billion dollar question. *Int J Parasitol.* 43(2): 133-142.

RENART, J., REISER, J., STARK, G.R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76 (7): 3116-3120.

RISCO-CASTILLO, V., FERNANDEZ-GARCIA, A., ORTEGA-MORA, L.M. 2004. Comparative analysis of stress agents in a simplified in vitro system of *Neospora caninum* bradyzoite production. *J Parasitol.* 90(3): 466-470.

RODRIGUES, A.A.R., GENNARI, S.M., AGUIAR, D.M., SREEKUMAR, C., HILL, D.E., MISKA, K. B. DUBEY, J.P. 2004. Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil. *Vet Parasitol.* 124(3): 139-150.

ROJAS, M., VÁZQUEZ, P. 2009. Prácticas de manejo potencialmente riesgosas en la ganadería de cría. I Aspecto Regional. *Vet Arg.* Vol. N° XXVI N° 254

ROJAS, M.C., VÁZQUEZ, P. 2008. Aspectos relevantes para la toma de decisiones en la cría bovina en la Cuenca del Salado. Publicación técnica N° 4. ISSN 1850-6496. Pp 3-4.

ROMAND, S., THULLIEZ, P., DUBEY, J.P. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. Parasitol Res. 84: 50–53

ROMERO, J.J., BREDA, S.V., VARGAS, B., DOLZ, G., FRANKENA, K. 2005. Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica. Theriogenology. 64(9): 1928-1939.

ROSBOTTOM, A., GUY, C.S., GIBNEY, E.H., SMITH, R.F., VALARCHER, J.F., TAYLOR, G., WILLIAMS, D.J. 2007. Peripheral immune responses in pregnant cattle following *Neospora caninum* infection. Parasite Immunol. 29(4): 219-228.

ROUSSEAU, S., HEDMAN, K. 1988. Rubella infection and reinfection distinguished by avidity of IgG. The Lancet. 331(8594): 1108-1109.

SAGER H., HÜSSY D., KUFFER A., SCHREVE F., GOTTSTEIN B. 2005. First documentation of a *Neospora*-induced “abortion storm” (exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum*) in a Swiss dairy farm Schweiz. Arch. Tierheilk. 147: 113–120

SAGER, H., FISCHER, I., FURRER, K., STRASSER, M., WALDVOGEL, A., BOERLIN, P., AUDIGE, L., GOTTSTEIN, B. 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. Vet Parasitol. 102:1-15.

SÁNCHEZ, G.F., MORALES, S.E., MARTÍNEZ, M.J., TRIGO, J.F. 2003. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. Can J Vet Res. 67(2): 142.

SANDERSON, M.W., GAY, J.M., BASZLER, T.V. 2000. *Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. Vet Parasitol. 90(1): 15-24.

SAWADA, M., KONDO, H., TOMIOKA, Y., PARK, C.H., MORITA, T., SHIMADA, A., UMEMURA, T. 2000. Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. Vet Parasitol. 90(3): 247-252.

SCHARES G., BÄRWALD A., STAUBACH C., ZILLER M., KLÖß D., WURM R., RAUSER M., LABOHM R., DRÄGER K., FASEN W., HESS R.G., CONRATHS F.J. 2003. Regional distribution of bovine *Neospora caninum* infection in the German state of Rhineland-Palatinate modelled by logistic regression. *Int J Parasitol.* 33: 1631-1640.

SCHARES, G., BARWALD, A., STAUBACH, C., SÖNDGEN, P., RAUSER, M., SCHRODER, R., PETERS, M., WURM, R., SELHORST, T., CONRATHS, F.J. 2002. P38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol.* 106: 293-305.

SCHARES, G., BÄRWALD, A., STAUBACH, C., ZILLER, M., KLÖSS, D., SCHRÖDER, R., CONRATHS, F.J. 2004. Potential risk factors for bovine *Neospora caninum* infection in Germany are not under the control of the farmers. *Parasitology.* 129(03): 301-309.

SCHARES, G., PETERS, M., WURM, R., BARWALD, A., CONRATHS, F.J. 1998. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol.* 80: 87-98.

SERRANO-MARTINEZ, E., CASAS-ASTOS, E., CHÁVEZ-VELÁSQUEZ, A., COLLANTES-FERNÁNDEZ, E., ALVAREZ-GARCIA, G., ORTEGA-MORA, L.M., RODRÍGUEZ-BERTOS, A. 2004. *Neospora* species associated abortion in alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Llama glama*). *Vet Rec.* 155(23): 748-749.

SERRANO-MARTÍNEZ, E., FERRE, I., OSORO, K., ADURIZ, G., MOTA, R.A., MARTÍNEZ, A., ORTEGA-MORA, L.M. 2007. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology.* 67(4): 729-737.

SHIVAPRASAD, H.L., ELY, R., DUBEY, J.P. 1989. A *Neospora*-like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Vet Parasitol.* 34: 145-148.

ŠLAPETA, J.R., MODRÝ, D., KYSELOVÁ, I., HOŘEJŠ, R., LUKEŠ, J., KOUDELA, B. 2002. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Vet Parasitol.* 109(3): 157-167.

SÖNDGEN, P., PETERS, M., BÄRWALD, A., WURM, R., HOLLING, F., CONRATHS, F.J., SCHARES, G. 2001. Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Vet Parasitol.* 102(4): 279-290.

STENLUND, S., KINDAHL, H., MAGNUSSON, U., UGGLA, A., BJÖRKMAN, C. 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 85: 227-234.

STYRT, B., SUGARMAN, B. 1991. Estrogens and infection. *Rev Infect Dis.* 13(6): 1139-1150.

TENNENT-BROWN, B.S., POMROY, W.E., REICHEL, M.P., GRAY, P.L., MARSHALL, T.S., MOFFAT, P.A., RITVANEN, S. 2000. Prevalence of *Neospora* antibodies in beef cattle in New Zealand. *N Z Vet J.* 48(5): 149-150.

THILSTED, J.P., DUBEY, J.P. 1989. Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest.* 1(3): 205-209.

THORNTON, R.N., THOMPSON, E.J., DUBEY, J.P. 1991. *Neospora* abortion in New Zealand cattle. *N Z Vet J.* 39: 129-133.

THURMOND, M., HIETALA, S., BLANCHARD, P.C. 1997. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum* induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. *J Vet Diagn Invest.* 9: 44-49.

THURMOND, M.C., HIETALA, S.K. 1997. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am J Vet Res.* 58: 1381-1385.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76 (9): 4350-4354

TREES, A.J., WILLIAMS, D.J. 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21(12): 558-561.

TREES, A.J., DAVISON, H.C., INNES, E.A., WASTLING, J.M. 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int J Parasitol.* 29: 1195-1200.

TUNEV, S.S., MCALLISTER, M.M., ANDERSON-SPRECHER, R.C., WEISS, L.M. 2002. *Neospora caninum* in vitro: evidence that the destiny of a parasitophorous vacuole depends on the phenotype of the progenitor zoite. *J Parasitol.* 88(6): 1095-1099.

VAN MAANEN, C., WOUDA, W., SCHARES, G., VON BLUMRÖDER, D., CONRATHS, F.J., NORTON, R., HEMPHILL, A. 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol.* 126(4): 351-364.

VÁZQUEZ, P., ROJAS, M. 2006. Zonificación Agro – ecológica del área de influencia de la EEA Cuenca del Salado. Publicación Técnica N°2. ISSN 1850 – 6496. 17 pp.

VIANNA, M.C.B., SREEKUMAR, C., MISKA, K.B., HILL, D.E., DUBEY, J.P. 2005. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Parasitol.* 129(3): 253-257.

VON BLUMRÖDER, D., STAMBUSCH, R., LABOHM, R., KLAWONN, W., DRÄGER, K., FASEN, W., SCHARES, G. 2006. Potential risk factors for the serological detection of *Neospora caninum*-infections in cattle herds in Rhineland-Palatinate (Germany). *Tierärztliche Praxis Großtiere*, 34(3): 141-147.

VONLAUFEN, N., GIANINAZZI, C., MÜLLER, N., SIMON, F., BJÖRKMAN, C., JUNGI, T.W., HEMPHILL, A. 2002. Infection of organotypic slice cultures from rat central nervous tissue with *Neospora caninum*: an alternative approach to study host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* 32(5): 533-542.

WALDNER, C.L., JANZEN, E.D., RIBBLE, C.S. 1998. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. *J Am Vet Med. Assoc.* 213 (5):685-690.

WALDNER, C.L., JANZEN, E.D., HENDERSON, J., HAINES, D.M. 1999. Outbreak of abortion associated with *Neospora caninum* infection in a beef herd. *J Am Vet Med Assoc.* 215 (10): 1485-90.

WEISS, L.M., MA, Y.F., HALONEN, S., McALLISTER, M.M., ZHANG, Y.W. 1999. The in vitro development of *Neospora caninum* bradyzoites. *Int J Parasitol.* 29(10): 1713-1723.

WILKOWSKY, S.E., BAREIRO, G.G., MON, M.L., MOORE, D.P., CASPE, G., CAMPERO, C., ROMANO, M.I. 2011. An applied printing immunoassay with recombinant Nc-SAG1 for detection of antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 23(5): 971-976.

WILLIAMS, D.J.L., GUY, C.S., McGARRY, J.W., GUY, F., TASKER, L., SMITH, R. F., TREES, A.J. 2000. *Neospora caninum* associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology.* 121(04): 347-358.

WOUDA, W., MOEN, A.R., SCHUKKEN, Y.H. 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology.* 49: 1311-1316.

WOUDA, W., DIJKSTRA, T., KRAMER, A.M.H., VAN MAANEN, C., BRINKHOF, J. M.A. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *Int J Parasitol.* 29(10): 1677-1682.

WOUDA, W., DUBEY, J.P., JENKINS, M.C. 1997. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J Parasitol.* 83: 545-547.

YAMANE, I., KOKUHO, T., SHIMURA, K., ETO, M., SHIBAHARA, T., HARITANI, M., CONRAD, P.A. 1997. In vitro isolation and characterisation of a bovine *Neospora* species in Japan. *Res Vet Sci.* 63(1): 77-80.

YAO, L., YANG, N., LIU, Q., WANG, M., ZHANG, W., QIAN, W.F., DING, J. 2009. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitology.* 136(11): 1251-1256

9. TABLAS, FIGURAS Y FOTOS

Tabla 1: Seroprevalencia de *N. caninum* en rodeos para carne encontrados en diferentes regiones del mundo.

PAIS	N° DE ANIMALES	PREVALENCIA (%)	TÉCNICA DIAGNÓSTICA	REFERENCIAS
Alemania	2022	4,1	ELISA	Bartels <i>et al.</i> , 2006
Argentina	400	4,7	IFI	Moore <i>et al.</i> , 2002
Bélgica	93	14	IFI	De Meerschman <i>et al.</i> , 2002
Canadá	1806	9,0	ELISA	Waldner <i>et al.</i> , 1999
Corea	438	4,1	IFI	Bae <i>et al.</i> , 2002
EE.UU	1009	12,9	DAT	Barling <i>et al.</i> , 2000
EE.UU.	2585	23	ELISA	Sanderson <i>et al.</i> , 2000
España	1712	17,9	ELISA	Quintanilla-Gozalo <i>et al.</i> , 1999
España	2407	16,0	ELISA	Bartels <i>et al.</i> , 2006
Francia	219	4,1	ELISA	Ould-Amrouche <i>et al.</i> , 1997
Holanda	1601	13,3	ELISA	Bartels <i>et al.</i> , 2006
Nueva Zelandia	499	2,8	ELISA	Tennent- Brown <i>et al.</i> , 2000
Paraguay	582	26,6	ELISA	Osawa <i>et al.</i> , 2000

Tabla 2: Fetos abortados positivos a *N. caninum* por IHC en rodeos para carne y leche de Argentina. Adaptado de Moore *et al.*, 2002

	Rodeos (n)	Total	Porcentaje
Carne	6	87	6,9*
Leche	15	28	39,5*
Total	21	125	16,8

* p: 0,001

Tabla 3: Diagnóstico de infección de *N. caninum* en fetos abortados. Adaptado de Ortega–Mora *et al.*, 2007

Objetivo	Prueba	Sensibilidad	Especificidad
Enfermedad	Histología	+ /++ (¿)	¿
Parásito	IHQ	+ /++ (¿)	¿
Parásito	PCR	+++	+++
Parásito	Cultivo celular	(+) (¿)	+++
Parásito	Infección en animales de experimentación	(+) (¿)	+++
Anticuerpo parásito – específico	IFI	+++	+++
Anticuerpo parásito – específico	ELISA	+++ (¿)	+++
Anticuerpo parásito – específico	Inmunoblot	+++	+++

Tabla 4: Características de cada uno de los sistemas.

	Intensivo	Semi-intensivo	Tradicional
Carga	2 EV/ha	1,1 EV/ha	0,75 EV/ha
Manejo reproductivo	Servicio estacionado desde el 1ro de Noviembre al 31 de enero		
	IATF + repaso con toros	IATF + repaso con toros	Sincronización de celo + servicio natural
Manejo nutricional	Campo natural (37%) + pastura de festuca (45%) + avena (18%) + maíz planta	Campo natural (50%) + pastura de festuca (50%)	Campo natural (100%)

	entera como autoconsumo
Estado corporal promedio anual (1 - 5)	3
Manejo sanitario	Examen prepucial en toros para diagnóstico de enfermedades venéreas Vacunación contra enfermedades reproductivas, diarrea neonatal, carbunco, brucelosis y aftosa

Tabla 5: Cronograma de sangrados de las vacas multíparas

Momentos	0	1	2	3	4	5	6	7
Fecha	12/04/12	25/07/12	15/10/12	04/01/13	10/04/13	04/07/13	29/10/13	09/01/14
Intervalos en días	0	104	82	81	96	85	117	72

Tabla 6: Cronograma de sangrados de las vaquillonas de reposición.

Momentos	0	1	2	3	4	5
Fecha	14/06/12	14/09/12	26/10/12	08/01/13	20/05/13	27/07/13
Intervalos en días	0	92	42	74	132	68

Tabla 7: Seroprevalencia a *Neospora caninum* según momentos de muestreo en cada uno de los sistemas utilizando IFI

Rodeo	Momentos							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Intensivo								
Pos/total	1/72	4/72	2/72	0/72	2/72	4/65	4/65	2/65
Seroprevalencia	1,4%	5,5%	2,8%	0%	2,7%	6,1%	6,1%	3,0%
Semi-intensivo								
Pos/total	2/72	2/72	2/72	3/72	3/72	3/68	3/68	2/68
Seroprevalencia	2,8%	2,8%	2,8%	4,2%	4,2%	4,4%	4,4%	2,9%
Tradicional								
Pos/total	4/72	6/72	7/72	5/72	2/72	2/67	2/67	1/67
Seroprevalencia	5,5%	8,3%	9,7%	6,9%	2,8%	2,9%	2,9%	1,5%

Tabla 8: Resultado a la IFI en vacas multíparas según rodeo intensivo (IN): semi-intensivo (SI) y tradicional (T) que presentaron títulos en algún momento a lo largo del trabajo.

Rodeo	N°	Títulos de IFI								
		0	1	2	3	4	5	6	7	
INTENSIVO	118	1:200	1:400	1:200	1:100	1:200				
	45	1:25	1:25	1:25	1:25	Neg	1:50	1:50	1:100	
	90	1:25	1:25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
	106	1:25	1:25	Neg	1:25	Neg	Neg	Neg	Neg	
	132	1:25	1:200	1:200	1:100	1:200	1:200	1:200	Neg	
	9001	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	1:800	1:1600	1:100	
	9008	Neg	1:1600	Neg	Neg	1:25	1:200	1:800	1:200	
	9009	Neg	1:800	Neg	Neg	Neg	1:800	1:800	1:200	
SEMI-INTENSIVO	32	1:1800	1:6400	1:800	1:1600	1:1600	1:800	1:1600	1:200	
	56	1:3200	1:6400	1:3200	1:200	1:1600	1:6400	1:1600	1:400	
	69	Neg	Neg	Neg	Neg	1:400	1:1600	1:800	1:100	
	77	1:25	1:25	1:25	1:25	1:100				
	9014	Neg	Neg	Neg	Neg	1:25	1:800	1:100	1:50	
TRADICIONAL	30	Neg	Neg	1:200	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
	40	1:200	1:3200	1:800	1:400	1:1600	1:200	1:400	1:200	
	44	Neg	1:400	1:800	1:400	Neg				

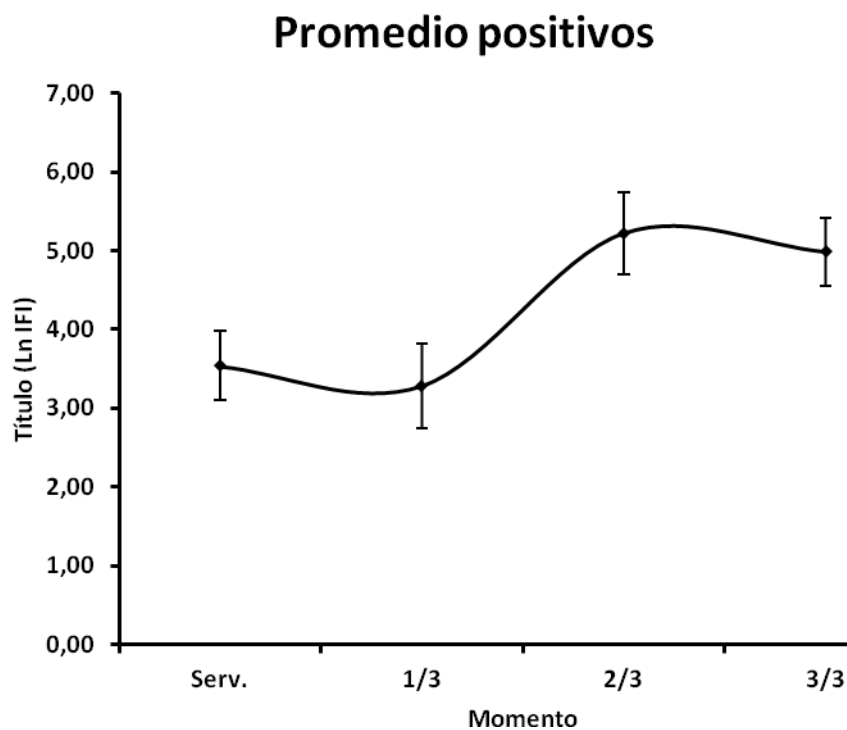
45	1:3200	1:800	1:200	1:800	1:200	1:400	1:200	1:25
47	Neg	1:400	1:400	1:400	1:100	1:100	1:200	1:100
74	1:800	1:400	1:400	1:200	Neg	Neg	1:800	1:400
77	Neg	1:400	1:200	1:100	Neg	1:100	1:200	Neg
82	1:400	Neg	Neg	1:100	1:100	Neg	Neg	Neg

Tabla 9: Incidencia acumulada en cada uno de los rodeos.

Momentos	Intensivo				Semi-intensivo				Tradicional			
	Sanos	Nuevos casos	Total casos	IA	Sanos	Nuevos casos	Total casos	IA	Sanos	Nuevos casos	Total casos	IA
0	64	.	1	.	66	.	2	.	63	.	4	.
1	61	3	4	0,063	66	0	2	0,030	56	3	7	0,111
2	61	0	4	0,066	66	0	2	0,030	55	1	8	0,143
3	61	0	4	0,066	66	0	2	0,030	55	0	8	0,145
4	61	0	4	0,066	64	2	4	0,061	55	0	8	0,145
5	60	1	5	0,082	64	0	4	0,063	55	0	8	0,145
6	60	0	5	0,083	64	0	4	0,063	55	0	8	0,145
7	60	0	5	0,083	64	0	4	0,063	55	0	8	0,145

Tabla 10: Riesgo relativo en cada uno de los sistemas.

Sistema	IA	RR	IC 95%	P (95%)
INTENSIVO	0,083	1,286	(0,355 – 4,524)	0,714
SEMI-INTENSIVO	0,063	1	(0,260 – 3,84)	1
TRADICIONAL	0,145	2,22	(0,702 – 7,024)	0,160

Figura 1: Cinética de anticuerpos en 30 gestaciones de vacas seropositivas**Tabla 11:** Resultado del test de avidez

		Intensivo	Semi-intensivo	Tradicional
Avidéz	Alta	1/5 (20%)	2/4 (50%)	3/8 (37,5%)
	Intermedia	3/5 (60%)	1/4 (25%)	3/8 (37,5%)
	Baja	1/5 (20%)	1/4 (25%)	2/8 (25%)



Foto 1: Pastoreo directo de avena en el sistema intensivo



Foto 2: Autoconsumo de silo de planta entera de maíz en el sistema intensivo



Foto 3: Pastoreo de pasturas cultivadas en el sistema semi-intensivo



Foto 4: Momento en el cual se decidía inmovilizar al ternero recién parido para la obtención de la muestra de sangre previo a la ingestión de calostro

Tabla 12: Resultados de la IFI en vaquillonas del rodeo intensivo

n° caravana	Momentos					
	0	1	2	3	4	5
9	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
14	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
17	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
33	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
39	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
41	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
45	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
55	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
56	Neg	1:25	Neg	Neg	Neg	Neg
63	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
65	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
69	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
72	Neg	1:25	1:25	Neg	Neg	Neg
73	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
74	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
84	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
87	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
96	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
105	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
118	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
119	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
119	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
122	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
125	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
134	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
140	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
143	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
148	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Tabla 13: Resultados de la IFI en vaquillonas del rodeo semi-intensivo

n° caravana	Momentos					
	0	1	2	3	4	5
1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
2	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
10	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
12	1:100	1:50	1:50	Neg	Neg	Neg
14	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
18	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
20	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
28	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
31	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
32	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
33	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
36	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
39	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
40	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
43	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
45	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
48	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
48	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
52	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
53	1:50	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
55	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

57	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
60	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
65	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
66	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
68	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
70	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
73	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
74	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
75	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Tabla 14: Resultados de la IFI en vaquillonas del rodeo tradicional

n° caravana	Momentos					
	0	1	2	3	4	5
54	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	
57	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
58	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
64	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
65	Neg		Neg	Neg	Neg	Neg
66	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
70	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
251	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
253	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
257	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
260	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
262	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
269	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
270	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
272	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
273	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

274	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
281	1:25	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
282	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
283	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
285	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
286	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
289	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
292	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
294	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
295	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
296	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
297	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
298	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg