

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS



**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA**

**“COMPARACIÓN DE INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA Y ELISA PARA LA
DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum* EN SUEROS
BOVINOS RECOLECTADOS EN FINCAS DE LAS PROVINCIAS DE PICHINCHA,
BOLÍVAR Y SANTO DOMINGO DE LOS TSÁCHILAS”**

**MARÍA DANIELA ESCOBAR SARABIA
KARLA VERÓNICA VARGAS RAMOS**

DIRECTORA: MASTER LETTY GARCÍA

QUITO, 2011

DEDICATORIA

A Dios por guiar nuestro camino y darnos la sabiduría necesaria para seguir adelante, cumpliendo nuestras metas y anhelos.

A nuestros padres y hermanos por apoyarnos incondicionalmente, y constituir el pilar fundamental en nuestra formación.

Daniela

Karla

AGRADECIMIENTO

A la PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, por promover la investigación científica y apoyar en la realización de proyectos que promueven el crecimiento de los estudiantes.

A la Escuela de Bioanálisis, por su apoyo en cada labor realizada y por brindarnos la oportunidad de desarrollarnos en el ámbito estudiantil y personal.

Y a la Máster Letty García por guiarnos en nuestro desarrollo y aprendizaje.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
TABLA DE CONTENIDOS	iv
INDICE DE ILUSTRACIONES	vi
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE ANEXOS	viii
ABREVIATURAS Y SIGLAS	ix
RESUMEN.....	x

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1	Introducción.....	1
1.2	Justificación	1
1.3	Planteamiento del problema.....	2
1.4	Objetivos de la investigación.....	4
1.4.1	<i>Objetivo general</i>	4
1.4.2	<i>Objetivos específicos</i>	4

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1	Generalidades	5
2.2	Género Neospora.....	5
2.2.1	<i>Taxonomía</i>	5
2.2.2	<i>Características Generales del microorganismo</i>	5
2.2.3	<i>Características de crecimiento</i>	6
2.2.4	<i>Distribución</i>	7
2.2.5	<i>Ciclo Biológico</i>	8
2.2.6	<i>Transmisión</i>	11
2.2.7	<i>Patogenia</i>	12
2.2.7.1	<i>Hembras</i>	12
2.2.8	<i>Respuesta Inmune</i>	13
2.2.9	<i>Diagnóstico de Laboratorio</i>	14
2.3	Serodiagnóstico.....	15
2.3.1	<i>Inmunofluorescencia indirecta</i>	17
2.3.2	<i>ELISA</i>	19
2.4	Control y Prevención	23

CAPÍTULO III

3.1	Localización.....	26
3.2	Muestra	27
3.3	Procedimiento	27
3.3.1	Muestreo	27
3.3.2	Técnica ELISA.....	27
3.3.3	Técnica IFI.....	28
3.4	Análisis Estadístico	28
3.4.1	Sensibilidad (S)	29
3.4.2	Especificidad (E)	30
3.4.3	Índice de Youden (IY).....	30
3.4.4	Eficiencia o exactitud (EF)	30
3.4.5	Valor predictivo de un resultado positivo (VPRP)	31
3.4.6	Valor predictivo de un resultado negativo (VPRN)	31
3.4.7	Concordancia entre las dos técnicas serológicas.....	31

CAPÍTULO IV

Resultados y Discusión	33
------------------------------	----

CAPÍTULO V

Conclusiones y Recomendaciones	36
--------------------------------------	----

ANEXOS.....	37
-------------	----

BIBLIOGRAFÍA.....	51
-------------------	----

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1: Ooquiste	7
Ilustración 2: Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i>	10
Ilustración 3: Feto momificado.....	12
Ilustración 4: Respuesta inmune durante la gestación.....	13
Ilustración 5: Respuesta de infección de ganado no preñado	14
Ilustración 6: Estructura de los anticuerpos	16
Ilustración 7: Microscopia de Fluorescencia	18
Ilustración 8: Fundamento del ELISA.....	19
Ilustración 9: Principio de un ELISA competitivo	21
Ilustración 10: Vacuna Bovilis® Neoguard	24
Ilustración 11: Rads de sueros.....	27
Ilustración 12: Prevalencia de la infección en las tres provincias de estudio mediante la técnica de ELISA e IFI	35
Ilustración 13: Materiales (ELISA)	43
Ilustración 14: Colocación de sueros en la Microplaca e incubación.....	44
Ilustración 15: Lavado.....	44
Ilustración 16: Conjugado	45
Ilustración 17: Sustrato	45
Ilustración 18: Solución de Parada.....	45
Ilustración 19: Lector de ELISA.....	46
Ilustración 20: Materiales y Reactivos (IFI)	47
Ilustración 21: Dilución de muestras.....	48
Ilustración 22: IFI	48
Ilustración 23: Lavado de la placa	49
Ilustración 24: Secado	49
Ilustración 25: Colocar anti-Ig G o Ig M	49
Ilustración 26: Montaje.....	50
Ilustración 27: Microscopio de Fluorescencia.....	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Prevalencia de anticuerpos en vacas y detección de <i>Neospora caninum</i> en fetos de Latinoamérica.	8
Tabla 2: Antígenos de taquizoítos de <i>N. caninum</i>	16
Tabla 3: Tipos de ELISA desarrolladas para el diagnóstico de la infección causada por <i>N. caninum</i>	22
Tabla 4: Tabla de contingencia	29
Tabla 5: Cálculo de las características diagnósticas	29
Tabla 6: Valoración del Coeficiente Kappa (Valor k)	32
Tabla 7: Prevalencia de anticuerpos contra <i>Neospora caninum</i> evaluada con la técnica de ELISA e IFI por provincia.	34

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Inserto de instrucciones <i>NEOSPORA CANINUM</i> ANTIBODY TEST KIT, cELISA	37
Anexo 2: Validación del Kit por la Casa Comercial VMRD	39
Anexo 3: Certificado de análisis de IFI.....	40
Anexo 4: Certificado de análisis de fluido de montaje	42
Anexo 5: Procedimientos para la técnica de ELISA competitiva	43
Anexo 6: Procedimientos para la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta	47

ABREVIATURAS Y SIGLAS

C.E.	Concordancia esperada
CP	Control positivo
CN	Control negativo
C.O.	Concordancia observada
°C	Grados centígrados
DO	Densidad óptica
E	Especificidad
EF	Eficiencia o exactitud
ELISA	Enzimo Inmuno Ensayo
% I	Porcentaje de Inhibición
IFI	Inmunofluorescencia
IFI INDIRECTA	Inmunofluorescencia Indirecta
IFI DIRECTA	Inmunofluorescencia Directa
IgG	Inmunoglobulina G
IL-12	Interleuquina 12
IL-2	Interleuquina 2
INF- γ	Interferón- γ
IHQ	Inmunohistoquímica
IY	Índice de Youden
κ	Kappa
<i>N. caninum</i>	<i>Neospora caninum</i>
NAT	Test de Aglutinación para <i>Neospora caninum</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Prov	Provincia
S	Sensibilidad
SNC	Sistema Nervioso Central
μm	Micras
VPRP	Valor predictivo de un resultado positivo
VPRN	Valor predictivo de un resultado negativo

RESUMEN

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria provocada por un protozoario parásito intracelular llamado *Neospora caninum* que es prevalente en todos los continentes. La enfermedad se caracteriza por provocar lesiones neuromusculares graves y causar aborto tanto en ganado lechero como del productor de carne originando pérdidas económicas cuantiosas, motivo por el cual es necesaria su vigilancia.

El objetivo del presente trabajo fue buscar la concordancia entre las técnicas Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Se tomó como prueba de referencia diagnóstica a la técnica IFI (VMRD) en la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*. Se determinó la sensibilidad (S), la especificidad (E), el valor predictivo de un resultado positivo (VPRP) y el valor predictivo de un resultado negativo (VPRN) de la técnica enzimoimmunoensayo.

Se evaluaron 343 sueros de bovinos de diferentes haciendas de las zonas de Pintag (Prov. de Pichincha), Alluriquín (Prov. de Santo Domingo de los Tsáchilas) y Salinas (Prov. de Bolívar). Las muestras fueron facilitadas por el proyecto Seroprevalencia de enfermedades reproductivas bovinas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (SERB-PUCE II). Las técnicas ELISA competitiva e inmunofluorescencia indirecta se realizaron en el Laboratorio Veterinario de la PUCE.

Mediante el cálculo del valor kappa se obtuvo un $k = 0,89$. La técnica de ELISA tuvo una S de 100 % y E de 95 %, VPRP de 85 % y un VPRN de 100%. Las prevalencias encontradas para *Neospora caninum* fueron de 27,1 % mediante la técnica de ELISA, y el 23% mediante la técnica de IFI.

Se concluyó que la concordancia entre ELISA e IFI fue muy alta, es decir que la fuerza de concordancia es casi perfecta, pese a que los kits usan antígenos no nativos del Ecuador.

Palabras Claves: *Neospora caninum*, serología, enzimoimmunoensayo, inmunofluorescencia, haciendas, sensibilidad, especificidad, seroprevalencia, neosporosis.

CAPÍTULO I

1.1 Introducción

Neospora caninum es un protozoo del Phylum *Apicomplexa*, familia *Sarcocystidae*, causante de la neosporosis en animales. No se reconoce a *Neospora caninum* como un patógeno humano. *N. caninum* es morfológicamente similar a *Toxoplasma gondii* y está relacionado a otros protozoos formadores de quistes como *Hammondia* o *Besnoitia*, sin embargo fue descrito como una especie distinta en 1988 (Dubey J. y., 1996).

Neospora caninum tiene un amplio rango de hospedadores, entre estos se encuentran animales domésticos, como bovinos, felinos, caninos, ovinos, equinos, y animales silvestres, como coyotes, zorros y lobos (Del Campo 2008). Se ha comprobado que el hospedador definitivo de *Neospora caninum* es el perro y también el lobo. Se ha reconocido también que el perro puede comportarse como hospedador intermediario.

Actualmente el diagnóstico de *Neospora caninum* se ha profundizado. Se han desarrollado una serie de técnicas diagnósticas como: exámenes histopatológicos de fetos abortados, pruebas inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo inmunoenzimático ligado (ELISA), Test de Aglutinación (NAT). La Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una opción diagnóstica más reciente, limitada a ciertos laboratorios. Dentro de las pruebas de diagnóstico indirecto las técnicas de ELISA e IFI, son muy útiles, sin embargo la serología positiva sólo es indicativa de exposición al protozoo.

1.2 Justificación

La Neosporosis es un problema emergente y de distribución mundial que afecta al ganado bovino, con repercusión en los costos para el productor. Si no es detectada a tiempo afecta

la productividad de la hacienda porque los animales crónicamente infectados son un foco de diseminación dentro del rebaño.

La importancia de la presente investigación radica en la comparación de las técnicas serológicas IFI y ELISA, cuyos resultados determinan la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum*. Estas dos técnicas son las más utilizadas y se manejan a nivel de diagnóstico veterinario como pruebas de laboratorio. Evaluarlas conjuntamente permite compararlas y además probarlas en un contexto diferente al lugar de origen de los reactivos.

Neospora caninum es considerado como patógeno importante que afecta la economía de cualquier sector ganadero, pues las vacas seropositivas son más vulnerables a presentar aborto que aquellas que son seronegativas. Dos de las provincias estudiadas representan un peso importante dentro del sector ganadero del país como son las provincias de Pichincha y Santo Domingo de los Tsáchilas. Fuente obtenida del INEC, donde se informó que el número de cabezas de ganado vacuno creció un 6,1 por ciento entre 2008 y 2009 y que, de las 5,2 millones de cabezas registradas en 2009, 50,39% se registraron en la región Sierra del país. (INEC 2008-2009)

La veracidad de la investigación se sustenta en exámenes de laboratorio aplicadas a 343 bovinos de las tres provincias; muestras representativas que fue factible realizarlas en el tiempo programado. Los hallazgos positivos permitieron hacer recomendaciones para el control de la diseminación del parásito.

1.3 Planteamiento del problema

La *Neospora caninum* es un parásito intracelular que afecta a los bovinos en cualquier parte del mundo. En Ecuador sobre todo en las provincias de la Región Sierra, se han presentado problemas reproductivos en bovinos relacionados con *Neospora caninum* (Lozada E. , 2004). La presencia de animales con infección asintomática constituye núcleos de diseminación dentro del rebaño y el consecuente riesgo de infección de animales sanos.

Conocer y seleccionar las técnicas de laboratorio más adecuadas, así como saber de las ventajas y limitaciones para su aplicación en un contexto determinado es una cuestión

fundamental en la práctica de laboratorio, debido a que de esta manera se puede aportar de forma satisfactoria en la prevención de esta enfermedad, lo que ayudaría en gran medida a evitar grandes pérdidas económicas – reproductivas en las diferentes haciendas ganaderas de nuestro país.

Frente a lo dicho se planteó la necesidad de identificar anticuerpos contra *Neospora caninum*, mediante técnicas serológicas seleccionadas, ELISA e IFI, y la respectiva comparación de los resultados obtenidos entre éstas dos pruebas, para lo cual se usaron sueros de ganado bovino de fincas localizadas en las provincias de Bolívar, Santo Domingo, y Pichincha. Se aprovechó la experiencia de que en dichas zonas se encontró una seroprevalencia variable de *Neospora caninum*, conforme el estudio “Seroprevalencia de enfermedades infecciosas bovinas: leptospirosis, brucelosis, neosporosis y leucosis en un mínimo de tres haciendas de cada una de las provincias de Pichincha, Santo Domingo y Bolívar” realizado en la PUCE en el 2008. De donde se obtuvieron los siguientes valores: seroprevalencia de 27.1 % mediante ELISA, y de un 23.0 % mediante IFI.

La comparación de las dos técnicas mencionadas, permitirá conocer y valorar los resultados de ELISA frente a IFI y determinar así su aplicabilidad en nuestro medio, con reactivos producidos en otro país (USA), que por tanto no contienen antígenos nativos del Ecuador. Los mismos que pueden ser aplicables en las diferentes zonas de donde se obtuvieron los sueros bovinos, con el debido consentimiento de los dueños, o en los lugares que se vean en la necesidad emergente de solucionar problemas reproductivos en sus ganados, donde los ganaderos serán los más favorecidos debido a que se evitaban pérdidas económicas.

Además de cumplir con el propósito esencial de comparar dos de las más importantes técnicas usadas en el serodiagnóstico de *Neospora caninum*, el estudio permite establecer la seroprevalencia para este parásito. Los resultados son de mucho interés no solo para las provincias involucradas sino también para el país.

En vista de lo expuesto mediante el presente estudio se pretende resolver la siguiente interrogante:

¿Qué correlación existe entre los resultados obtenidos en ELISA con la técnica IFI, de los sueros bovinos analizados?

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo general

- Comparar las técnicas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Enzimoimmunoensayo (ELISA) para detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en 343 sueros bovinos recolectados en fincas de las provincias de Pichincha, Bolívar y Santo Domingo de los Tsáchilas, en el año 2009.

1.4.2 Objetivos específicos

- Detectar anticuerpos contra *Neospora caninum* mediante la técnica de IFI a los 343 sueros bovinos obtenidos en el estudio (SERB – PUCE).
- Establecer si existe diferencia estadísticamente significativa entre la seroprevalencia evaluada con la técnica IFI, en comparación a la determinada con el método de ELISA que se evaluó como parte del proyecto PUCE: “Seroprevalencia de enfermedades reproductivas bovinas en las haciendas de las provincias de Pichincha, Bolívar y Santo Domingo de los Tsáchilas, (SERB - PUCE II)”
- Determinar el grado de concordancia de las técnicas IFI y ELISA en la población de estudio.

CAPÍTULO II

2.1 Generalidades

Neospora caninum fue reconocido por primera vez por Dubey en 1984, como un protozoario causante de miositis y encefalitis en perros (Lértora, A, & Catuogno). Luego que *Neospora caninum* fue reconocido como causa de enfermedad en los perros, se identificaron en fetos bovinos abortados momificados, y en terneros con parálisis neonatal. La enfermedad en bovinos ha sido reconocida en diversas partes del mundo, y actualmente se ha demostrado que los caninos y los bovinos se infectan con la misma especie de microorganismo (Moore, 2001).

2.2 Género *Neospora*

2.2.1 Taxonomía

N. caninum se incluye dentro del phylum Apicomplexa, familia Sarcocystidae, junto con los géneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* y *Besnoitia* (Dubey *et al.*, 1988a; Ellis *et al.*, 1994). Esta familia se caracteriza por tener ciclos biológicos heteroxenos y formar quistes en el hospedador intermediario. Los hospedadores definitivos eliminan en las heces ooquistes sin esporular, y una vez en el medio ambiente, estos esporulan, y presentan en su interior dos esporoquistes con cuatro esporozoítos cada uno (Del Monte 2008).

2.2.2 Características Generales del microorganismo

El parásito *Neospora caninum* es un protozoo intracelular, que suele observarse en sus tres estadios parasitarios:

- Quistes son redondos u ovales, miden hasta 107 μm (Bjerkas D. &, 1991). Su estructura, está compuesta por una pared quística primaria y una capa granular gruesa y contienen estadios parasitarios de lenta replicación denominados bradizoítos los cuales son delgados, miden 6-8 μm de longitud por 1-1,8 μm de anchura. (CDV 2010).
- Ooquistes son esféricos o subesféricos (Ilustración 1), miden 10 a 11 μm y contienen dos esporocistos con cuatro esporozoítos cada uno, que son eliminados en el aparato gastrointestinal del hospedador definitivo; luego los ooquistes se eliminan en las heces del perro (Dubey J. y., 1996).
- Taquizoíto tienen forma de media luna o globular, miden 3 a 7 μm de largo por 1 a 5 μm de ancho, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren. (Dubey J. C., 1989). Estos son detectados en varios tipos de tejidos como: cerebro, medula espinal, corazón, pulmón, hígado, membranas fetales, músculo, placenta y piel. (CDV 2010)

2.2.3 Características de crecimiento

En el bovino se desarrollan dos estadios: los taquizoítos y los bradizoítos. El hospedador intermediario ingiere los ooquistes (Ilustración 1) que son eliminados en las heces del perro, al llegar al intestino delgado del bovino salen los esporozoítos de los ooquistes hacia la luz intestinal donde empiezan a reproducirse.

Los taquizoítos infectan y se multiplican rápidamente en una amplia variedad de células incluyendo neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, hepatocitos y células renales, invadiendo al feto por vía transplacentaria (Valentini). Debido a la respuesta inmune del huésped los taquizoítos se transforman en bradizoítos, que se dividen lentamente formando quistes tisulares en el sistema nervioso central (Campillo, 1999). Los quistes contienen bradizoítos que miden 1 a 2 μm x 6 a 8 μm . En estados de inmunodepresión, los quistes se rompen y la infección se reagudiza (Patitucci A, M, & M., 2001). El riesgo de aborto se da generalmente entre el 5-7 mes de gestación. (Hattel et al 1998).

La neosporosis se manifiesta con lesiones producidas en el sistema nervioso central, donde se evidencia encefalitis; y en la placenta donde se manifiesta con un proceso inflamatorio agudo con necrosis focal, lo que afecta la relación estrecha con el feto.

Ilustración 1: Ooquiste



Fuente: (Murray, 2010)

2.2.4 Distribución

La infección natural por *N. caninum* se ha descrito en el perro y en el ganado bovino, en la cabra, la oveja, el caballo y, recientemente, en el búfalo de agua y en el camello. En animales silvestres, la infección ha sido detectada en el ciervo el antílope, el mapache el coyote, y el zorro. La infección experimental ha sido establecida en el ratón la rata, el gato, el perro, la oveja. (Del Monte 2008).

En diferentes países de Latinoamérica se muestran prevalencias en vacas de lechería en un rango de 4 y 60%, valores que varían según la región considerada y el tipo de prueba serológica usada (Tabla 1). En Ecuador se han mostrado prevalencias tan altas como del 70-100%. (Lozada E. , 2004), y tan bajos como del 10%.

Tabla 1: Prevalencia de anticuerpos en vacas y detección de *Neospora caninum* en fetos de Latinoamérica.

País	Tipo de animal	Positivos/Nº muestras	Positivos (%)	Técnica	Referencia
Argentina	Feto lechería	20/82	24,4	IFAT	Venturini et al. 1999
	Feto carne	1/22	4,5		
	Vacas abortadas	122/189	64,5		
	Feto lechería	26/354	7,3	IHQ	Campero, 2002
	Vacas lechería	---	16,1	IFAT	
	Lechería s/probl.	174/1048	16,6		Moore et al, 2002
	Lechería c/probl.	323/750	43,1	IFAT	
	Fetos	29/43	67,4	IHQ	
	Carne	15/305	4,9	IFAT	Moore et al, 2003 b
	Fluidos fetales (carne y leche)	26/66	27,4	IFAT	Moore et al, 2003 a
Brasil	Lechería	63/447	14,1	IFAT	Gondim et al, 1999
	Feto	25/223	11,2	IFAT	Corbellini et al, 2002
	Lechería	89/663	14,3	IFAT	Guimarães et al, 2004
	Fetos	37/161	23,0	Histopatol.	Corbellini et al, 2005
	Fetos	34/161	21,1	IHQ	
Chile	Lechería	---	50,0	ELISA	Meléndez et al, 1999
		---	20,0	IFAT	
	Lechería	20/55	36,4	IFAT	Pattitucci et al, 1999
	Lechería	83/371	22,4	IFAT	Pattitucci et al, 2000
Colombia	Lechería	193/357	54,1	ELISA	Zambrano et al, 2001
Ecuador	Lechería	166/395	42,0	ELISA	Lozada, 2004
México	Feto lechería	73/211	34,5	Histopatol.	Morales et al, 2001
	Feto lechería	41/73	56,2	IHQ	
	Lechería	110/187	58,8	ELISA	García-Vázquez et al, 2002
Paraguay	Lechería	107/297	36,0	ELISA	Osawa et al, 2002
	Carne	155/582	26,6		
Perú	Fetos lechería	16/29	55,2	IHQ	Rivera et al, 2000
	Lechería	18/29	62,1	IFAT	
Uruguay	Lechería	135/844	16	ELISA	Piaggio et al, 2004
	Lechería	130/217	60	IFAT	Kashiwazaki et al, 2004

Fuente:(Valenzuela, 2005)

2.2.5 Ciclo Biológico

Se conocían algunas especies hospedadoras implicadas en el ciclo biológico de *N. caninum* mediante la única vía existente hasta el año de 1998, la transplacentaria, que fue determinado gracias a los estudios experimentales de McAllister *et al.* (1998), los cuales

fueron definitivos en el conocimiento de la biología de este parásito, y que determinaron al perro como hospedador definitivo de *N. caninum*.

Los perros en sus heces eliminan los ooquistes, los cuales contaminan el pasto que luego es ingerido por los bovinos o por los hospedadores intermediarios (ovinos, caprinos, equinos, caninos y bovinos) y, por consiguiente, el modo de transmisión horizontal se da al ingerir alimentos contaminados con ooquistes o restos de fetos abortados y placenta, además puede transmitirse a los terneros mediante la transmisión vertical provocando aborto o el nacimiento de terneros infectos. (Ilustración 2).

Se conocen tres estadios del ciclo biológico de *N. caninum*, el taquizoíto, el quiste tisular con bradizoítos en su interior y el ooquiste (Ilustración 1).

Los taquizoítos, responsables de la fase aguda de la infección, pueden invadir una gran variedad de tipos celulares en el hospedador parasitado incluyendo macrófagos, neutrófilos, células neuronales, hepatocitos, fibroblastos, miocitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos y renales (Dubey *et al.*, 1988b; Bjerkas & Presthus, 1989; Speer & Dubey, 1989).

En los perros infectados que presentan cuadros de parexia los taquizoítos se encuentran con frecuencia en la musculatura estriada, aislándose fácilmente del músculo cuádriceps. *N. caninum* es un parásito intracelular obligado, por tanto el reconocimiento de la célula hospedadora es un requisito necesario para que tenga lugar la invasión y multiplicación.

Ilustración 2: Ciclo de vida de *Neospora caninum*



Fuente:(García G. Á., 2003)

Los taquizoítos penetran en la célula hospedadora mediante invasión activa en menos de 5 minutos, localizándose en el interior de una vacuola parasitófora en el citoplasma. En el interior de la vacuola parasitófora los taquizoítos se multiplican. Tras la ruptura celular, los taquizoítos salen al medio extracelular y en pocas horas se iniciarán los mecanismos de adhesión e invasión de nuevas células diana (Hemphill *et al.*, 1996). La destrucción celular y, por consiguiente, la enfermedad depende de un equilibrio entre la habilidad de los taquizoítos para penetrar y multiplicarse en la célula hospedadora y la habilidad del hospedador para inhibir la multiplicación del parásito.

2.2.6 Transmisión

Las evidencias sugieren que la transmisión vertical, principalmente vía transplacentaria y posiblemente también vía calostro, es el principal modo de contagio de la enfermedad natural siendo la infección postnatal poco importante. (CMV, 2010)

La detección de anticuerpos precalostrales frente a *N. caninum* en el suero de terneros nacidos de vacas seropositivas indica la existencia de infección intrauterina.

La transmisión vertical es el modo más frecuente de transmisión de infección en el ganado bovino. Está demostrado que, una vez adquirida la infección *-in útero-* de los terneros, aún cuando se produzca la infección prenatal del feto, no siempre se desarrolla la enfermedad y el parásito se aloja silenciosamente en el tejido de los terneros recién nacidos en forma inaparente, probablemente de por vida, y así transmitir la infección a sus descendientes consecutivamente o no (VETERINARIO, 2010).

El otro modo de transmisión se da a través de la ingestión de ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo (el perro) que contaminarían el alimento a ser ingerido por los bovinos. Este modo es conocido como transmisión horizontal. El descubrimiento del perro como un hospedador definitivo para *N. caninum* puso de manifiesto la posible transmisión horizontal de la infección, ya que se detectó la eliminación de ooquistes en las heces del perro.

2.2.7 Patogenia

Ya en el organismo, los taquizoítos pueden infectar las células de casi todos los tejidos del animal, con mayor afinidad por las células del Sistema Nervioso Central (SNC), células musculares esqueléticas y cardíacas y células endoteliales, ocasionando la destrucción de las mismas con la consiguiente aparición de focos de necrosis, que constituyen la principal lesión de esta enfermedad.

2.2.7.1 Hembras

En las hembras se inicia con el aborto del embrión o la presencia de feto momificado (Ilustración 3), y el nacimiento de terneros congénitamente infectados con o sin sintomatología. La infección al comienzo de la gestación suele originar la muerte del feto, mientras que a mitad de la gestación puede provocar la muerte fetal o el nacimiento de terneros infectados, los cuales pueden presentar sintomatología al nacimiento. Finalmente, si la infección se produce en la última fase de la gestación suelen nacer terneros infectados sin sintomatología aparente, los cuales pueden transmitir la infección a la descendencia si son mantenidos en el rebaño como ganado de reposición. (Del Monte 2010).

Ilustración 3: Feto momificado



Fuente:(Dra. Andrianarivo, 2003)

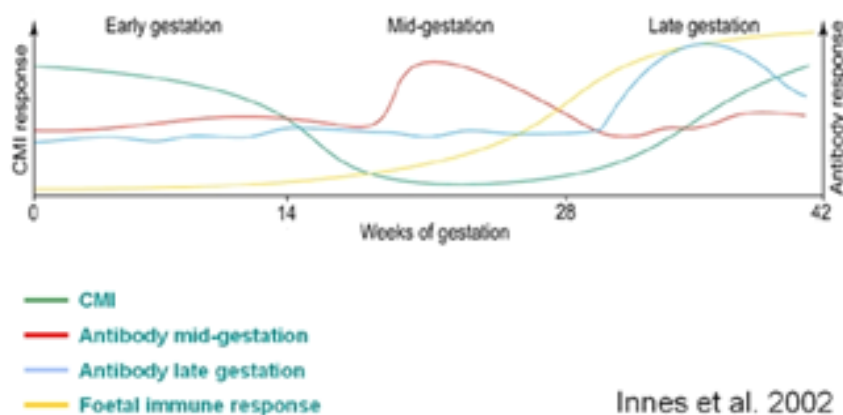
Existen algunos factores que desencadenan el desarrollo de la enfermedad como:

- momento de la gestación en el que se produce la parasitemia
- cantidad y duración de la parasitemia,
- capacidad del feto para desarrollar una respuesta inmune

2.2.8 Respuesta Inmune

N. caninum es un parásito intracelular obligado, por lo cual tanto la respuesta de anticuerpos, como los mecanismos implicados en la respuesta celular son importantes elementos de la respuesta inmune frente a *N. caninum*. (CMV, 2010) En el primer trimestre de la gestación el feto es incapaz de reconocer al patógeno, por lo cual es vulnerable a la infección con *N. caninum* y es bastante improbable que sobreviva. En el segundo tercio de la gestación el feto ya es capaz de producir una respuesta inmune, la que se evidencia por presencia de anticuerpos en el suero de fetos abortados. Esta respuesta puede no ser suficiente ya que la mayoría de los abortos ocurre en este período. Sin embargo, si la infección ocurre en el último tercio de la gestación el feto es capaz de sobrevivir y nacer infectado clínicamente sano, es decir que tenga la enfermedad pero que no presente síntoma alguno. (Ilustración 4).

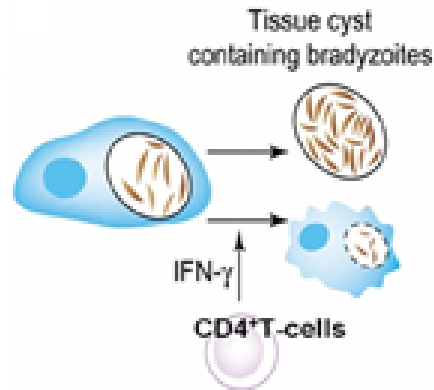
Ilustración 4: Respuesta inmune durante la gestación



Fuente: (Innes et al. 2002)

Se ha comprobado que las vacas infectadas persistentemente desarrollan una inmunidad natural protectora contra una segunda exposición a *Neospora*. La principal respuesta inmune protectora contra infecciones de parásitos intracelulares es la respuesta mediada por células, asociada a linfocitos T helper tipo 1, los cuales estimulan la producción de interferón γ (IFN- γ), interleuquina 12 (IL-12) e IL-2. Aunque, en las vacas gestantes se generan una disminución en la respuesta inmune entre los 4 y 6 meses de gestación, lo cual favorecería la multiplicación del parásito y por lo tanto, también la transmisión. (Dubey).

Ilustración 5: Respuesta de infección de ganado no preñado



Fuente: (Andrianarivo, 2003)

2.2.9 Diagnóstico de Laboratorio

Un diagnóstico directo permite determinar la presencia de infección. La examinación de los fetos mediante técnicas histopatológicas que permiten la detección de lesiones, el aislamiento del parásito, su identificación, la detección de sus ácidos nucleicos es necesaria para el correcto diagnóstico de neosporosis. Por ello es importante enviar al laboratorio el feto completo, en caso de no ser posible, enviar al menos la cabeza del feto ya que el tejido más afectado en los fetos es el cerebro, incluso en el caso de fetos momificados o con autólisis avanzada. La inmunohistoquímica (IHC) es la técnica más usada para demostrar la presencia de *Neospora* en los tejidos (Lindsay & Dubey, 1989). En la actualidad la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha probado ser un método suficientemente robusto para detectar DNA de *N. caninum* (Sager et al., 2001) en suero, leche, fluidos vaginales y saliva.

La serología materna y fetal es considerada una ayuda importante en el diagnóstico indirecto de la infección, el diagnóstico en el laboratorio se realiza mediante la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum* en el suero.

En vacas, se consideran como indicador de aborto por este parásito las reacciones positivas con títulos altos, pero no se excluyen otras etiologías, a la inversa la ausencia de detección de anticuerpos excluiría la neosporosis como causante de aborto. El hallazgo de anticuerpos

contra *N. caninum* en vacas que abortaron no confirma que la neosporosis haya sido la causa (Manuel, 2004). Hay que reconocer que la neosporosis no puede ser considerada como la única causa de aborto en bovinos, existen otras enfermedades como, Brucella, Leptospira, (principales causas en Perú) (scielo, 2009)

2.3 Serodiagnóstico

La serología ha sido usada habitualmente como objeto para desarrollar estudios epidemiológicos buscando la asociación entre *N. caninum* y abortos en bovinos.

Las técnicas serológicas Inmunofluorescencia y ELISA demostraron ser excelentes técnicas para la determinación de anticuerpos para *Neospora caninum*. Según estudios realizados (Baszler et al. 1996), en donde se determinó mediante ELISA una sensibilidad de 97,6 % y una especificidad de 98,6 %. En tanto que IFI muestra 98 % y 99 % de sensibilidad y especificidad respectivamente (Packham et al. 1998), en sueros analizados en varias haciendas de tres estados de Lima-Perú dedicadas a la ganadería. Esto ha permitido que estas técnicas sean usadas con mucha frecuencia en los laboratorios de diagnóstico veterinario.

Para la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum* se utilizan una amplia variedad de antígenos inmuno-reactivos que han sido descritos (Tabla 2). Los antígenos inmunodominantes de *N. caninum* fueron detectados como un grupo de moléculas con un peso de 37, 29/30, 16/17 y 46 kDa. Los antígenos de 29/30 y 37 kDa (p37 y p29/30) son los que muestran mayor consistencia por lo que se reconocen como los más importantes para ser utilizados en los test serológicos, (Barta & Dubey, 1992) y (Bjerkas, 1994).

Tabla 2: Antígenos de taquizoítos de *N. caninum*

Designación recomendada	Peso molecular (kDa)		Localización celular
	Estimado	Aparente	
SAG1	28,2 ^a	29/36 ^b	Membrana externa
SRS2	34,1	35/43	Membrana externa
GRA6	19,0	37	Gránulo denso
GRA7	23,0	33	Gránulo denso
NTP3/NTPasa-1	66,3	67	Gránulo denso

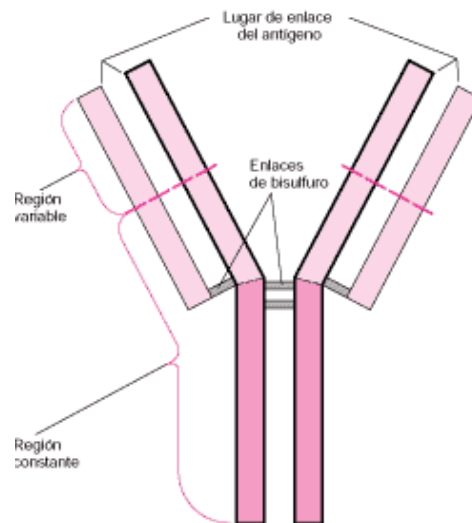
^a Masa molecular de la proteína basada en la secuencia de amino-ácidos.

^b Masa molecular de la proteína basada en la migración sobre SDS-PAGE; condiciones de no reducción / reducción.

Fuente:(D.P. Moore & M.C. Venturini, 2005)

Estas técnicas son posibles, debido a que los anticuerpos constan de dos partes, una región variable (que es la que reconoce al antígeno) y una región constante (que forma el esqueleto y estructura básica de la molécula de anticuerpo) Ilustración 6. Es importante notar sin embargo, que esta división es artificial y que en realidad la molécula de anticuerpo se encuentra formada por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas y dos livianas, estas últimas son las que contienen la región variable.

Ilustración 6: Estructura de los anticuerpos



Fuente: (Merck Sharp & Dohme de España, 2005)

Es posible que existan varios anticuerpos que reconozcan diferentes antígenos (es decir que tengan diferentes regiones variables) pero que compartan la misma región constante. Todos estos anticuerpos con diferentes especificidades pueden ser reconocidos a su vez por un único anticuerpo secundario que reconozca la región constante. Esto ahorra el esfuerzo técnico y el costo de modificar cada uno de los anticuerpos primarios para acarrear el fluoróforo.

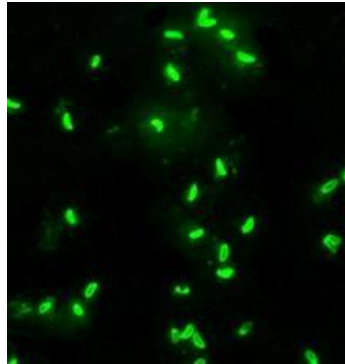
2.3.1 Inmunofluorescencia indirecta

La IFI fue la primera prueba serológica empleada en la detección de anticuerpos específicos (IgG) frente a *N. caninum* en el suero de animales infectados. (Patitucci A, M, & M., 2001) Posteriormente, se ha empleado ELISA porque permite evaluar un número elevado de muestras.

La IFI detecta anticuerpos séricos que se unen a los antígenos de *Neospora caninum* fijados a las células presentes en las placas de reacción. Se considera un resultado positivo cuando se observa fluorescencia en toda la superficie celular, que normalmente aparece cuando se analizan sueros con títulos moderados o altos, sin embargo cabe recalcar que la interpretación también va dirigida a la intensidad de la fluorescencia emitida y al número de células fluorescentes. Una coloración únicamente apical o la ausencia de fluorescencia se consideran como negativo. Por ejemplo reacciones cruzadas con *T. gondii* pueden mostrarse como reacciones apicales, por ello hay que tener cuidado en la lectura e interpretación de este tipo de resultados. (Atkinson).

En una reacción positiva se produce una interacción antígeno – anticuerpo, entre los anticuerpos de la muestra y el antígeno (cultivo de células vero infectadas con *Neospora caninum*) fijadas en la placa de reacción. Posteriormente todo el excedente es eliminado mediante un proceso de lavado con PBS pH 9,0. El conjugado que está constituido por anti (IgG) marcada con fluoresceína reacciona con el anticuerpo bovino. La reacción positiva se observa como una coloración verde brillante (Ilustración 7) debido a la fluoresceína que contiene el conjugado.

Ilustración 7: Microscopia de Fluorescencia



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

En la Inmunofluorescencia indirecta se combinan la sensibilidad de la técnica histológica y la especificidad de las técnicas inmunoenzimáticas. La prueba de inmunofluorescencia indirecta se utiliza para detectar anticuerpos anti-*Neospora* en el suero de las vacas que abortan o en el suero o líquidos fetales, ha sido ampliamente usada para el diagnóstico, siendo considerada como prueba de referencia al compararse con otras técnicas. (Dubey & Lindsay, 1996).

Las ventajas de la IFI son que es una técnica reproducible, permite tinciones dobles e incluso se aplica en microscopia confocal. Esta técnica requiere el uso de buenos controles y apropiada experiencia del analista, microscopio de luz UV, y registro de horas de trabajo de la lámpara, además nos permite llevar a cabo análisis serológicos semicuantitativos, esta última característica es una ventaja importante sobre la técnica de ELISA.

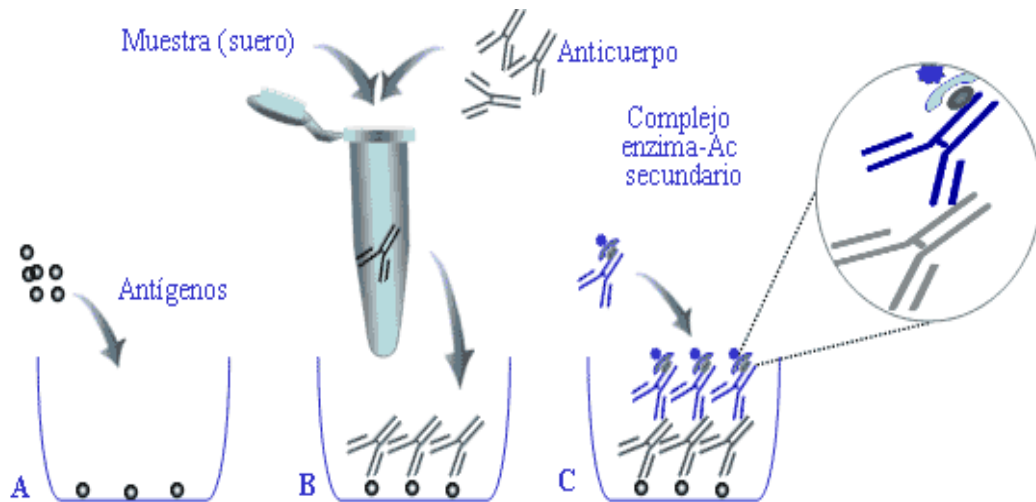
Las desventajas son, que las reacciones no son permanentes y que es necesario fotografiar las reacciones positivas para documentar los casos. Un problema muy significativo con la inmunofluorescencia es el fotoblanqueo, es decir la pérdida de la actividad fluorescente causada por la exposición a la luz. Esta pérdida de actividad puede ser controlada reduciendo la intensidad o el tiempo de exposición a la luz, incrementando la concentración de fluoróforo, o empleando fluoróforos que sean menos propensos al fotoblanqueo (Burtis CA 2008). Además, requiere microscopio de fluorescencia, que es un instrumento de relativo alto costo. (Biocientífica 2008), y que por esta razón no todos los laboratorios la disponen.

2.3.2 ELISA

La técnica ELISA se fundamenta en la detección de anticuerpos. La sencillez y rapidez de su realización y la fácil interpretación de los resultados, la capacidad de automatización y el bajo costo económico son ventajas que se consideran al momento de realizar análisis y con un número elevado de muestras. Estas pruebas utilizan distintos tipos de antígenos: taquizoítos sonicados, taquizoítos fijados con formalina, partículas Iscoms (Tabla 3).

Las primeras proteínas recombinantes empleadas como antígeno en el ELISA para la detección de anticuerpos para *N. caninum*, fueron las proteínas de gránulos densos NcGRA6 y NcGRA7 (Lally et al., 1996b; Jenkins et al., 1997).

Ilustración 8: Fundamento del ELISA



Fuente: (Martínez, Inmunologiaonline, 2007)

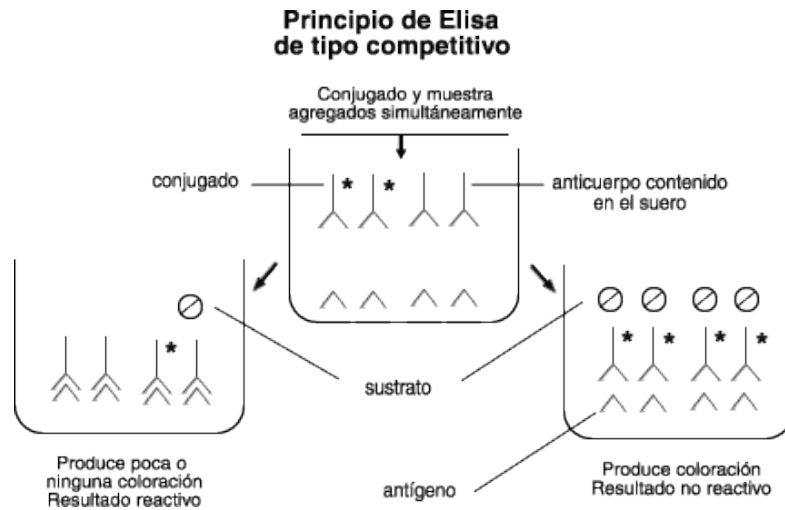
Existen algunos tipos de ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución, o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. Entre los más comunes están: ELISA *sándwich* para la determinación de anticuerpos contra *N. caninum* fue diseñada por Shares et al. (1999). Björkman et al. (1994) desarrolló también un ELISA soluble el cual usa como antígeno

un extracto de taquizoítos incorporado a un complejo inmunoestimulante (ISOCOM- ELISA) (Tabla 3). Baszler et al. (1996) describió un ELISA de competición (CI-ELISA) empleando un anticuerpo monoclonal (Mab 4A4-2) dirigido frente al antígeno de superficie de 65 kD del taquizoíto de *N. caninum*. También se han empleado taquizoítos fijados con formalina (Williams et al.,1997). Björkman et al (1999) describe un ELISA de avidéz que permite cuantificar la avidéz de las IgG anti-*N.caninum* presentes en el suero de los animales infectados y discriminar entre infecciones recientes y crónicas.

Los ELISAs convencionales emplean antígeno soluble de taquizoítos (Paré et al., 1995; Björkman & Ugglá, 1999) con alguna variante como el ELISA de competición, en el que se emplea un anticuerpo monoclonal que compite con los anticuerpos específicos del suero problema, confiriendo una mayor especificidad con respecto al ELISA indirecto tradicional.

El ELISA aplicado en el presente trabajo es de tipo competitivo (cELISA) detecta anticuerpos para *Neospora caninum* en ganado vacuno. Los antígenos inmunodominantes de *N. caninum* usados en el Kit de VMRD (Veterinary Medical Research & Development, Pullman, WA 99163, U.S.A.) capturados en la fase sólida es una proteína de 65 kDa usando anticuerpos monoclonales. Si la concentración de anticuerpos para *N. caninum* en el suero de la muestra es alta, muy poco del conjugado peroxidasa (HRP)-labeled *N. caninum* puede fijarse a los antígenos inmobilizados, ya que la muestra y el conjugado compiten por los mismos epítopes del antígeno p65 (Ilustración 9). Hay ausencia de coloración dado que no se produce la fijación del conjugado para unirse al sustrato. Inversamente, con muestras que contienen poco o ningún anticuerpo anti-*N. caninum*, se fijará más conjugado al antígeno en la fase sólida y la consiguiente adición de sustrato provocará la presencia de color. Por esto, la concentración de anticuerpos desconocidos en la muestra analizada es inversamente proporcional a la intensidad de color que aparece en los pocillos. Motivo por el cual en este estudio se eligió este tipo de ELISA (competitivo) debido al grado de sensibilidad que esta prueba posee al competir con anticuerpos monoclonales, en comparación con IFI.

Ilustración 9: Principio de un ELISA competitivo



Al existir varios tipos de ELISA, se han realizado estudios que ayudan a determinar la prueba más sensible y específica en la determinación de *Neospora caninum*. En una comparación entre los diferentes tipos de ELISA para diagnosticar *Neospora caninum*, realizado por García en el 2003 se determinó que el ELISA Indirecto que utiliza antígeno crudo presenta una sensibilidad y especificidad ($S=97,7$ y $E=95,6$) ante ELISA competitivo donde se obtuvo una mayor Sensibilidad de 98%, y una Especificidad de 96%. De igual forma se realizó la comparación con el ELISA Indirecto pero que utiliza taquizoitos los resultados variaron de forma significativa pero no en gran cantidad, por ejemplo la sensibilidad obtenida mediante esta prueba fue de 95 y la especificidad fue del 96, valor que no supera al obtenido con el mismo método pero con la variación del antígeno (crudo). Donde se puede presumir que las variaciones difieren según los antígenos utilizados y en este caso el Antígeno crudo sería el más óptimo debido a que la sensibilidad y especificidad son mayores que al utilizar como antígenos a los taquizoitos. Por este motivo se eligió trabajar con el ELISA competitivo por su mayor sensibilidad y especificidad frente a los demás tipos de ELISA.

Tabla 3: Tipos de ELISA desarrolladas para el diagnóstico de la infección causada por *M. caninum*.

Tipo de ELISA (Antígeno)	Punto de corte	Características diagnósticas		Aplicación diagnóstica	Técnica de referencia	Referencias
		Se*	Esp*			
Indirecto (Antígeno crudo)	D.O. = 0,45	97,7	95,6	Infección en adultos	IFI	Björkman <i>et al.</i> , 1994
	S/P = 0,45	88,6	96,5	Infección en adultos	IFI	Paré <i>et al.</i> , 1995a
	D.O. = 0,17	89	100	Infección en fetos	IFI	Osawa <i>et al.</i> , 1998
	D.O. = 0,40	97	100	Infección en adultos		
	S/P = 0,7	88	97	Infección en adultos - que han abortado	IHQ	Wouda <i>et al.</i> , 1998a
		98	92	- rebaños endémicos		
98		92	- rebaños normales			
I.R.C.P. = 5			Infección en adultos	IFI	Rebordosa <i>et al.</i> , 2000	
Sandwich	D.O. = 0,034	94,2	94,2	Infección en adultos -aborto epidémico y endémico	IFI y WB	Sehares <i>et al.</i> , 1999a
Competición (Antígeno crudo)	P.I. = 58%	-	-	Infección en adultos	WB	Baszler <i>et al.</i> , 1996
	P.I. = 10%	98	89	Infección en adultos	Mastazyme	Williams <i>et al.</i> , 2000
	P.I. = 15%	98	96			
	P.I. = 20%	98	96			
	P.I. = 30%	97,6	98,6	Infección en adultos	IFI e IHQ	Baszler <i>et al.</i> , 2001
96,4		96,8	IFI			
Indirecto (partículas Iscoms)	D.O. = 0,15-0,2	100	96	Infección en adultos	IFI	Björkman <i>et al.</i> , 1997
Indirecto (Taquizoítos)	D.O. = 0,77	95	96	Infección en adultos	IFI	Williams <i>et al.</i> , 1997
	P.P. = 20	97	95	Infección en adultos	IFI	Williams <i>et al.</i> , 1999
	P.P. = 20	85	90	- que han abortado		
	P.P. = 10	83	75	- rebaños endémicos		
			- rebaños normales			
Indirecto (Antígeno recombinante) NcDG1 y NcDG2	D.O. = 1,000	-	-	Infección en adultos	IFI	Lally <i>et al.</i> , 1996b Jenkins <i>et al.</i> , 1997
N54	D.O. = 0,04	95	96	Infección en adultos	IHQ	Louie <i>et al.</i> , 1997
N57	D.O. = 0,03	82	93			
SRS2	0,189	-	-	Infección en adultos	IFI y WB	Nishikakawa <i>et al.</i> , 2001c
SAG1 (Nc-p29)	(+)D.O.> 1,2	-	-	Infección en adultos	WB	Howe <i>et al.</i> , 2002
	(-)D.O.< 0,5					
Indirecto (Antígeno purificado por afinidad) p38	D.O. = 0,153	83	83	Infección en adultos	IFI	Sehares <i>et al.</i> , 2000
	D.O. = 0,149	78	78	Aborto epidémico		
	D.O. = 0,208	85	85	Aborto endémico		
p36 (avidez)	A.I. = 55%	92	92	Aborto epidémico – endémico	ELISA	Sehares <i>et al.</i> , 2002a

*Se: **Sensibilidad**; Esp: **Especificidad**

Fuente: (García G. Á., 2003)

2.4 Control y Prevención

La neosporosis se muestra como una causa más de aborto en bovinos, por tanto es importante el control de la enfermedad el cual debe ir orientado a reducir la prevalencia en las zonas con brotes declarados y a prevenir la propagación a otras zonas para evitar de tal forma la transmisión horizontal y vertical.

Hay que recalcar que el desarrollo de la enfermedad está relacionado en gran medida con el sistema inmune del huésped, además se cree que hay sensibilidad de *N. caninum* a ciertos antimicrobianos (Schlech, Lavigne, & Bortolussi., Epidemic listeriosis evidence for transmission by food., 1985) que ocasionaron la reducción del número de taquizoítos cultivados in vitro. Entre las más efectivas se encuentran la clindamicina, diclazuril, robenidina y pirimethamina. Sin embargo cabe recalcar que la eficacia de dichas drogas no ha sido aun estudiada en bovinos.

Existen vacunas que fueron aplicadas en diferentes estudios con el propósito de reducir el riesgo de abortos causados por *N. caninum*, si bien en el estudio realizado por Mainar-Jaime et al. (2001) no se encontró un efecto de dicha vacunación en el declinación de la incidencia de la infección y el aborto por *Neospora*.

Bovilis® Neoguard (Ilustración 6) es una vacuna inactivada que contiene organismos muertos de *Neospora caninum* y SPUR como adyuvante para aumentar la estimulación del sistema inmune. Es una suspensión acuosa inactiva lista para su aplicación en vacas gestantes sanas (www.intervet.com.mx). Durante el primer trimestre de gestación administre 5 ml por vía subcutánea. Aplicar una segunda dosis 3-4 semanas después. Se recomienda la revacunación con dos dosis en las gestaciones subsecuentes.

Ilustración 10: Vacuna Bovilis® Neoguard



Fuente:(www.intervet.com.mx)

La valoración de el efecto de Bovilis® Neoguard en la reducción de la tasa de abortos tuvo un respaldo de investigaciones internacionales por tal motivo la utilización de este biológico fue aceptado por USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) y se obtuvo la aprobación para su comercialización (Fabián Pita, 2011).

La experiencia de la vacuna a nivel de campo en Ecuador era la reducción en la tasa de abortos que se tenía en las ganaderías. Sin embargo la utilización de esta vacuna tenía un nicho reducido debido en gran parte al desconocimiento de los veterinarios y ganaderos sobre la enfermedad y el aporte que la vacuna podía hacer en ellas. Otro factor importante fue que las ganaderías eran portadores de otras enfermedades causantes de abortos como brucelosis, DVB, IBR, leptospirosis lo cual encubría los efectos de la vacuna sin ser aporte en la reducción de la tasa de abortos (Fabián Pita, 2011).

En la actualidad no se sigue vacunando porque se dejó de producir a nivel mundial la vacuna por la baja demanda del producto dando como resultado la falta de rentabilidad para la compañía ya que era un biológico costoso.

Actualmente no existe tratamiento alguno en el mercado ecuatoriano para el control de la neosporosis, sin embargo podemos destacar las medidas que podrían contemplarse para el control de la transmisión horizontal.

- ✓ Eliminar adecuadamente los fetos, fluidos y placentas, también vacas y terneros muertos, evitando que puedan ser ingeridos por los perros, lamidos por la hembra abortada o entrar en contacto con otras vacas.
- ✓ Evitar la exposición del alimento y agua, a las heces de perros.
- ✓ Eliminar contaminación por heces de perro de la paja que constituirá la cama para los bovinos.
- ✓ Evitar que los perros entren en las áreas de alojamiento de los animales.

CAPÍTULO III

3.1 Localización

Los sueros usados en el presente trabajo fueron obtenidos en el proyecto SERB-PUCE (II) en diferentes haciendas ubicadas en tres provincias del Ecuador: Pichincha, Santo Domingo de los Tsáchilas y Bolívar.

La zona de Pintag pertenece a la provincia de Pichincha, se ubica a 3.100 msnm, su temperatura promedio es 20°C. La principal actividad económica en la zona es la agricultura y textilería.

Alluriquín es una parroquia rural de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, cuya temperatura promedio es 22°C y se encuentra ubicada a 400 msnm. La principal actividad económica es la agricultura (café, palma africana, abacá, cacao, tubérculos, maíz, caucho, flores tropicales) ganadería e indicios de actividad turística.

Salinas es una parroquia localizada en la provincia de Bolívar, Cantón Guaranda, toma el nombre de Salinas por la presencia de las minas de sal en su territorio ubicada a 3.550msnm. Su temperatura promedio es de 13°C. El pueblo es el centro de una zona en la que existe una gran cantidad de actividades agroindustriales, artesanales y ganaderas.

Referencia obtenida según el INEC: el número de cabezas de ganado vacuno creció 6,1 por ciento entre 2008 y 2009 y que, de las 5,2 millones de cabezas registradas en 2009, 50,39% se registraron en la región Sierra del país.

En consonancia con esas cifras, la región Sierra, con 76,3%, es la zona con mayor producción de leche, seguida de la Costa, con 15,89%, y el Oriente, con 7,81%. (INEC 2008)

3.2 Muestra

Se trabajó con 343 sueros que fueron provistos por el Proyecto de Seroprevalencia de enfermedades reproductivas de la PUCE. (Proyecto anteriormente realizado). Muestras que fueron preservadas en congelamiento y analizadas paulatinamente.

3.3 Procedimiento

3.3.1 Muestreo

Esta etapa fue cumplida dentro del proyecto SERB-PUCE (II). Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena caudal o yugular, la cual se obtuvo en función de las facilidades disponibles en las fincas. La sangre fue recolectada por medio de un equipo de tubos al vacío sin anticoagulante. Las muestras fueron transportadas en condiciones de refrigeración hasta el Laboratorio de Veterinaria de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los sueros obtenidos (Ilustración 10) se mantuvo a congelación (-20°C) hasta el día de su procesamiento.

Ilustración 11: Rads de sueros



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

3.3.2 Técnica ELISA

Para la detección de anticuerpos específicos contra *N. caninum* se aplicó la técnica de ELISA competitiva para lo cual se usó el kit de la casa comercial VMRD (*NEOSPORA CANINUM* ANTIBODY TEST KIT, cELISA) cuyo fundamento se sustenta en la detección de anticuerpos en los sueros bovinos, presentando una mayor sensibilidad gracias a los

anticuerpos monoclonales que utiliza este kit. Anexo 1. Los materiales y procedimiento de la técnica se detallan en el Anexo 5.

3.3.3 Técnica IFI

La técnica de inmunofluorescencia indirecta es otro test que se usó para la detección de anticuerpos contra *N. caninum*. De igual forma que en la técnica de ELISA se usó los reactivos de la casa comercial VMRD (Anexo 3), El fundamento se sustenta en la fluorescencia que se obtiene una vez que se produjo la reacción del antígeno con los anticuerpos encontrados en la muestra y la posterior unión del conjugado marcado con el fluorocromo, para la determinación de la fluorescencia mediante la observación en el microscopio de UV. Los procedimientos se detallan en el Anexo 6.

3.4 Análisis Estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos se procedió a crear una base de datos en Microsoft Excel, la respectiva comparación y evaluación de ELISA frente a IFI que se basará en cálculos estadísticos para determinar los parámetros necesarios para brindar un diagnóstico confiable en base a criterios de validez y seguridad. Además, se realizó un estudio del grado de concordancia existente entre las dos pruebas serológicas mediante el cálculo del valor k (*kappa*).

Validez:

- ✓ Sensibilidad
- ✓ Especificidad
- ✓ Índice de Youden
- ✓ Eficiencia o Exactitud

Seguridad:

- Valor Predictivo de un resultado positivo
- Valor Predictivo de un resultado negativo

Se usa una tabla de contingencia para calcular los criterios de validez y seguridad, la cual consta de 4 posibles combinaciones: en dos de éstas la respuesta de la prueba es correcta

(**a** positivos verdaderos y **d** negativos verdaderos) y en las otras dos es falsa (**b** falsos positivos y **c** falsos negativos) (Tabla 4).

Tabla 4: Tabla de contingencia

		PRUEBA 1		
		Positiva	Negativa	Total
PRUEBA 2	Positiva	VP	FP	a + b
	Negativa	FN	VN	c + d
	Total	a + c	b + d	a+b+c+d

Tabla 5: Cálculo de las características diagnósticas

		PRUEBA DE REFERENCIA IFI		
		Positiva	Negativa	Total
PRUEBA ALTERNATIVA ELISA	Positiva	79	14	93
	Negativa	0	250	250
	Total	79	264	343

3.4.1 Sensibilidad (S)

La sensibilidad diagnóstica se define como la probabilidad de diagnosticar como positivo a un paciente cuando está en realidad enfermo:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{a}{a + c} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = \frac{79}{79 + 0} \times 100$$

$$\text{Sensibilidad} = 100 \%$$

3.4.2 Especificidad (E)

La especificidad diagnóstica se entiende como la probabilidad de diagnosticar como negativo a un paciente que realmente está sano:

$$\text{Especificidad} = \frac{d}{b + d} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{250}{14 + 250} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = 95\%$$

3.4.3 Índice de Youden (IY)

El índice de Youden corresponde a la suma de la sensibilidad más la especificidad menos uno. Varía de 0-1, cuyo valor máximo de 1 representa un diagnóstico ideal o perfecto:

$$\text{IY} = \frac{S + E}{100} - 1$$

$$\text{IY} = \frac{100 + 95}{100} - 1$$

$$\text{IY} = 0.95$$

Esto significa que el diagnóstico fue casi perfecto porque el IY fue de 0.95.

3.4.4 Eficiencia o exactitud (EF)

Es el rendimiento de la prueba para diagnosticar y corresponde a la probabilidad de clasificación correcta de la prueba:

$$\text{EF} = \frac{VP + VN}{N} \times 100 \quad \text{EF} = \frac{a + d}{N} \times 100$$

$$\text{EF} = \frac{79 + 250}{343} \times 100$$

$$EF = 95.91 \%$$

La Eficiencia o exactitud fue de 95.91% es decir la probabilidad de llegar al valor real del diagnóstico.

3.4.5 Valor predictivo de un resultado positivo (VPRP)

Es la capacidad de una prueba para detectar enfermos entre todos aquellos cuyo resultado dio positivo:

$$VPRP = \frac{a}{a + b} \times 100$$

$$VPRP = \frac{79}{79 + 14} \times 100$$

$$VPRP = 85$$

3.4.6 Valor predictivo de un resultado negativo (VPRN)

Es la capacidad de una prueba para detectar sanos entre los pacientes con resultado negativo:

$$VPRN = \frac{d}{c + d} \times 100$$

$$VPRN = \frac{250}{0 + 250} \times 100$$

$$VPRN = 100\%$$

3.4.7 Concordancia entre las dos técnicas serológicas

Para determinar el grado de concordancia entre las dos técnicas serológicas se calculó el valor κ (Coeficiente Kappa), que nos indica la fuerza de concordancia que se produce entre dos técnicas. Para calcular el valor κ es necesario una tabla de contingencia 2 x 2 (Tabla 4), en la que se muestran los resultados positivos y negativos de las técnicas serológicas.

Fórmula valor k:

$$K = \frac{C.O. - C.E.}{1 - C.E.}$$

Se calculó la concordancia observada (C.O.) y la concordancia esperada (C.E.) y, a partir de estos datos, el cálculo del valor κ .

$$C.O. = \frac{a + d}{N} = \frac{79 + 250}{343} = 0.9592$$

$$C.E. = \frac{\sum(a + c)(a + b) + \sum(b + d)(c + d)}{N^2} = \frac{79(93) + 264(250)}{343^2} = 0.6234$$

$$K = \frac{0.9592 - 0.6234}{1 - 0.6234}$$

$$K = 0.89$$

La valoración del valor κ puede tomar distintos valores entre -1 (discordancia absoluta) y +1 (concordancia absoluta), pasando por el 0 (concordancia debida exclusivamente al azar). Los valores comprendidos entre 0 y 0,20 se interpretan como concordancia débil; entre 0,20 y 0,40 concordancia escasa; entre 0,40 y 0,60 concordancia moderada y entre 0,80 y 1 concordancia casi perfecta(Thrusfield, 1995).

Tabla 6: Valoración del Coeficiente Kappa (Valor k)

Coeficiente Kappa	Fuerza de concordancia
0,00	Pobre
0,01 - 0,20	Leve
0,21 - 0,40	Aceptable
0,41 - 0,60	Moderada
0,61 - 0,80	Considerable
0,81 - 1,00	Casi Perfecta

CAPÍTULO IV

Resultados y Discusión

La seroprevalencia de anticuerpos para *Neospora caninum*, mediante la técnica de ELISA, del total de 343 muestras incorporadas en el presente estudio, evidenció 93 muestras positivas, que equivale a un 27,1%.

Lozada, F. 2004, en el trabajo “Determinación de la presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en hatos lecheros de la sierra Centro Norte del Ecuador, por Prueba Inmunoenzimática”, analizó, 395 vacas adultas; encontró como dato promedio que el 42% de las muestras eran positivas a la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum*; 2,8% sospechosas y el 55,2% fueron negativas.

Mientras que un estudio realizado en el Laboratorio de Veterinaria de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, revela que existe una seroprevalencia variable frente a *Neospora caninum*. Dicho estudio realizado en el año 2008, en el que se aplicó la técnica ELISA, muestra una prevalencia de 33.57% hasta 78.88%.(García & Torres, 2008), información verbal.

La seroprevalencia de anticuerpos para *Neospora caninum*, mediante la técnica de IFI, del total de 343 muestras de este estudio mostró 79 muestras positivas, que equivalen a un 23,0% en este estudio.

Campero, 2003, en un trabajo en el que utiliza la prueba de inmunofluorescencia (IF) analizó sueros de vacas de 22 tambos de la cuenca Mar y Sierras en la Provincia Santa Fe – Argentina sin información previa referente a *Neospora caninum*. El mismo permitió detectar 16,1% de vacas seropositivas existiendo al menos un animal positivo en el 95,4% de los rodeos lecheros en estudio.

Como se puede observar en estos resultados la presencia de esta enfermedad no está condicionada al tipo de producción, ya sea en ganado de carne o de leche y que afecta tanto hembras como machos, o entre el impacto de un aborto o repetición de celo es más notorio en hembras lo cual quizás sea de mayor importancia a estas, pero es importante considerar que toros seropositivos quizás en algún momento podrían ser la causa principal de diseminación, obviamente hasta el momento no se ha comprobado la transmisión de esta enfermedad por vía sexual.

En cuanto a distribución de la prevalencia por Provincia mediante la técnica de ELISA, con respecto a *Neospora caninum*, se encontró que en la zona estudiada de la Provincia de Sto. Domingo de los Tsáchilas resultaron 46 positivas (28,2%); en la de la Provincia de Pichincha se encontraron 27 positivas (27,8%) y en la de la Provincia de Bolívar resultaron 20 positivas (24,0%) por lo tanto no se presentó una diferencia significativa. Aunque en la provincia de Sto. Domingo de los Táchilas la cantidad de bovinos es mayor comparado con Pichincha y Bolívar, las prevalencias son similares en las 3 zonas estudiadas de las mencionadas provincias.

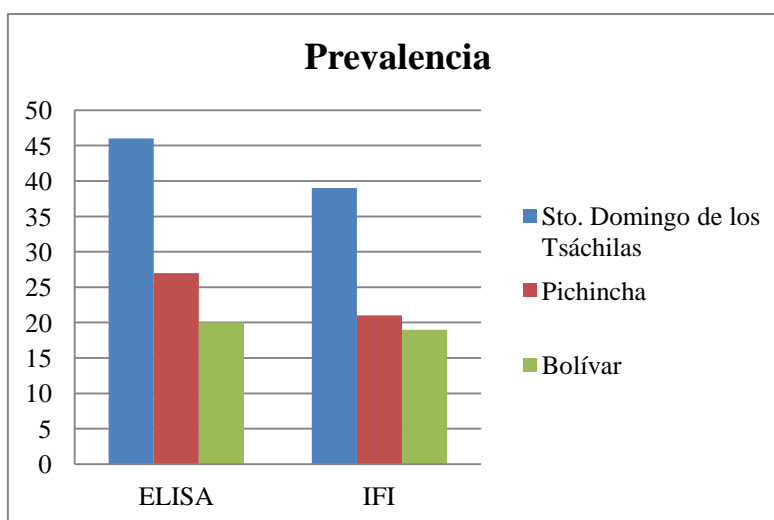
Tabla 7: Prevalencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* evaluada con la técnica de ELISA e IFI por provincia.

PROVINCIA	N°	ELISA		IFI	
		Positivo	%	Positivo	%
(Sto. Domingo de los Tsáchilas) Alluriquín	163	46	28,2	39	23,9
(Pichincha) Pintag	97	27	27,8	21	21,6
(Bolívar) Salinas	83	20	24,0	19	22,9
TOTAL	343	93	27,1	79	23,0

Los resultados obtenidos del SERB-PUCE para la seroprevalencia de *N. caninum* fueron, en la provincia de Sto. Domingo de los Tsáchilas 33.57%, en la provincia de Pichincha el 78.88% y en la provincia de Bolívar 37.73%. Los hallazgos en ambos estudios nos permite observar que la provincia de Pichincha tiene una alta seroprevalencia, mientras que en nuestro estudio es la provincia de Sto. Domingo.

Los anticuerpos detectados mediante las dos pruebas serológicas han demostrado la seroprevalencia de *N. caninum* en las diferentes haciendas de estudio de las tres provincias del Ecuador, como se demuestra en la (Ilustración 12). La *N. caninum* en el ganado bovino de la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas tiene una mayor seroprevalencia que en las provincias de Pichincha y Bolívar.

Ilustración 12: Prevalencia de la infección en las tres provincias de estudio mediante la técnica de ELISA e IFI



Sin embargo al comparar con los resultados obtenidos mediante la técnica de IFI que se detalla (Tabla 9) la cantidad de positivos es menor comparada con los obtenidos por ELISA, esto puede deberse a la variación de sensibilidad y especificidad que existe entre estos dos tipos de pruebas. No obstante de que los porcentajes de IFI y ELISA muestran diferencia, mediante el cálculo del valor de k que se detalla en la (Tabla 5), se obtuvo una concordancia muy alta ($\kappa = 0.89$), que al correlacionar con la valoración de la (Tabla 6), el valor k está dentro de la escala de (0,81 – 1,00) que quiere decir que hay una fuerza de concordancia casi perfecta entre las dos técnicas aplicadas en el diagnóstico de neosporosis bovina.

CAPÍTULO V

Conclusiones

Se encontró una concordancia casi perfecta entre las técnicas ELISA e IFI, establecida mediante el valor K. En base al objetivo principal que fue la comparación de las dos técnicas serológicas, se determinó que existen mayor resultados positivos mediante ELISA, habiendo una diferencia mínima entre IFI.

Las variaciones se pueden deber a las diferentes sensibilidades que poseen las pruebas. De donde se tomo como referencia la IFI.

Recomendaciones

Las dos técnicas son adecuadas para la detección de Anticuerpos contra *Neospora caninum*. ELISA se recomienda como técnica de elección por cuanto tiene una mayor sensibilidad, y por las ventajas que tiene en cuanto a equipamiento y manejo técnico.

Cabe destacar que en Ecuador aún falta mayor información acerca de la situación de esta enfermedad. Se necesitan estudios de laboratorio para detectar su presencia mediante el aislamiento del parásito, así como estudios epidemiológicos para determinar prevalencias regionales y nacionales.

Además de que al momento no existen vacunas contra esta enfermedad, debido a su discontinuación; se recomienda a los ganaderos tomar medidas precautelares en sus hatos y en sus haciendas, ya que ellos son los principales autores de que este tipo de enfermedades acabe con una buena producción en el sector ganadero, donde la principal causa según nuestro estudio se presenta de forma vertical.

Preparation

- a. **Warm up reagents:** Bring the serum samples, reagents and plate(s) to room temperature prior to starting the test.
- b. **Position controls and samples:** Run both the Positive Control (B) and Negative Control (C) in duplicate, regardless of the number of serum samples to be tested. When whole plates are used, it is best to put the controls in wells on different parts of the plate. Controls must be run on every plate. Enter the control and serum sample IDs on a photocopy of the attached Setup Record.
- c. **Prepare plates:** Remove the plate(s) from the foil pouch(es) (A). *If applicable:* Return any unused strips to the pouch and securely seal it. Call VMRD for extra pouches and sealer. Place strips to be used in the frame and number the top of each strip to maintain orientation with the Setup Record. Always mark the strips in case they fall out of the frame during washing.
- d. **Prepare conjugate:** Prepare 1X Antibody-Peroxidase Conjugate by diluting one part of the 100X Antibody-Peroxidase Conjugate (D) with 99 parts of Conjugate Diluting buffer (E). Example: For 96 wells, mix 60 µl of Antibody-Peroxidase Conjugate (D) with 5.940 ml of Conjugate Diluting Buffer (E) to yield 6 ml of ready-to-use Antibody-Peroxidase Conjugate. Fifty microliters (50 µl) are needed per well. Allow extra quantity for reservoirs, tubing, pipetting, etc.
- e. **Prepare wash solution:** Prepare 1X Wash Solution by diluting one part of the 10X Wash Solution Concentrate (F) with 9 parts of deionized or distilled water. Approximately 1.5 ml are needed per well. Allow extra quantity for reservoirs, tubing, pipetting, etc.
- f. **Prepare serum samples:** Serum samples are tested UNDILUTED.

Test Procedure

1. **Load controls and serum samples:** Using a pipettor set at 50 µl, transfer controls and serum samples to the Antigen-Coated Plate (A) according to the Setup Record. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the samples coat the bottom of the wells. Use care not to spill samples from well to well. Incubate the plate 1 hour at room temperature (21-25°C, 70-77°F), uncovered.
2. **Wash wells:** After the 1-hour incubation, wash the plate three times:

If an automatic washer is used, place the plate on the washing apparatus and wash plate three times, filling the wells each time with 1X Wash Solution.

If manual washing is used, dump contents of the wells into a sink and remove the remaining sera and controls by sharply striking the inverted plate four times on a clean paper towel, striking a clean area each time. Immediately fill each well with 1X Wash Solution using repeating syringe with a manifold, wash bottle or multichannel pipettor. Dump out the Wash Solution and strike the inverted plate sharply on a clean paper towel as above. Repeat the washing procedure two more times (three washes total).

3. **Add conjugate:** Add 50 µl of diluted Antibody-Peroxidase Conjugate to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the conjugate coats the bottom of the wells. Incubate for an additional 20 minutes at room temperature (21-25°C, 70-77°F), uncovered.
4. **Wash wells:** After the 20-minute incubation, repeat the washing procedure described in Step 2 (3 washes total).
5. **Add substrate solution:** Add 50 µl of Substrate Solution (G) to each well. Tap the side of the loaded assay plate several times to make sure the substrate coats the bottom of the wells. Incubate 20 minutes at room temperature (21-25°C; 70-77°F), uncovered. Avoid leaving the plate in direct sunlight. *Do not empty wells.*
6. **Add stop solution:** Add 50 µl of Stop Solution (H) to each well. Gently mix the well contents by tapping the side of the plate several times. *Do not empty wells.*
7. **Read and record the test result:** Immediately after adding the Stop Solution, the plate should be read on a plate reader. Set the optical density (O.D.) reading wavelength to 620, 630 or 650 nm. Blank reader on air and read plate(s). Some readers require an empty well on the plate for blanking. In this case, no reagents should be added to this well.
8. Return all remaining kit reagents to 2-7°C (35-45°F) for storage.

Test Validation

- The mean of the **Negative Controls** must produce an optical density ≥ 0.30 and < 2.50 .
- The mean of the **Positive Controls** must produce $\geq 30\%$ inhibition.
Calculation of percent inhibition (% I):
$$\% I = 100 - [(Sample\ O.D. \times 100) \div (Mean\ Negative\ Control\ O.D.)]$$

Interpreting the Results


- If a test sample produces $\geq 30\%$ inhibition, it is positive.
- If a test sample produces $< 30\%$ inhibition, it is negative.

USDA Veterinary License No. 332

Version 060614



Anexo 2: Validación del Kit por la Casa Comercial VMRD



VMRD, Inc.

P. O. Box 502
Pullman, WA 99163

Phone: (800) 222-8673
FAX: (509) 332-5356
E-mail: order@vmrd.com
techserve@vmrd.com
Web: www.vmrd.com

Neospora caninum Antibody Test Kit, cELISA



VMRD's *Neospora* test is a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) that detects antibodies against *Neospora caninum* in cattle sera. Our competitive ELISA format allows other species to be tested, but validation has been completed only on cattle. An immunodominant surface protein of 65 kDa is captured on the antigen plate using a monoclonal antibody. Another horseradish peroxidase-conjugated monoclonal antibody competes with serum antibodies for a specific epitope on p65. Sensitivity and specificity studies on both species confirm the high accuracy of this kit. In a mass screening of 4323 sera of unknown serologic status only 5% of sera fell within $\pm 5\%$ of the cut-off value, confirming a clear distinction between positive and negative sera bimodal distribution.

VMRD's *Neospora* kit is available in a 2-plate format with breakaway stripwells (and in a 5-plate format with breakaway stripwells by special order).

bovine samples		Reference Assay		
		+	-	Sum
VMRD <i>Neospora</i> cELISA	+	131	4	135
	-	6	319	325
Sum		137	323	460
Sensitivity: 96% • Specificity: 99%				

VMRD cELISA Field Testing, 2001.

Overview of the VMRD *Neospora* Kit Procedure

1	Add 50 μ l of samples and controls into Antigen Plate
2	Incubate 60 minutes at room temperature
3	Wash three times with Wash Solution
4	Add 50 μ l of Conjugate to all wells
5	Incubate Conjugate 20 minutes at room temperature
6	Wash three times with Wash Solution
7	Add 50 μ l of Substrate Solution to all wells
8	Incubate 20 minutes at room temperature
9	Add 50 μ l of Stop Solution to all wells
10	Read at 620-650 nm

Samples causing < 30% inhibition are negative. Samples causing $\geq 30\%$ inhibition are positive.

Formula for calculating % inhibition:
 $\%I = 100 - [(Sample\ OD / Mean\ Negative\ OD) \times 100]$

The mean OD of the Negative Control must be ≥ 0.300 and < 2.500. The percent inhibition of the Positive Control must be $\geq 30\%$.

KIT CONTENTS

Component	280-2
A Antigen-Coated Plates	2 plates
B Positive Control	3.6 ml
C Negative Control	3.6 ml
D 100X Antibody-Peroxidase Conjugate	300 μ l
E Conjugate Diluting Buffer	30 ml
F 10X Wash Solution Concentrate	120 ml
G Substrate Solution	30 ml
H Stop Solution	30 ml

An insert with Setup Record for recording sample identifications and results.

About Neosporosis

Neosporosis is a recently-described disease that has been identified across the world in various species, including dogs, cattle, sheep, goats, and horses. It is caused by *Neospora caninum*, a protozoan parasite closely related to *Toxoplasma gondii*. Even though the dog can be the definitive host for *Neospora*, it is not known if there are other definitive hosts. No signs of clinical illness are noted in cows that abort due to *Neospora* either prior to the abortion or post-abortion. The aborted fetuses are usually autolyzed with no gross lesions and placentas are not retained. Abortions have been diagnosed in both heifers and cows from three months gestation to term. A majority (78%) of *Neospora* abortions occur between four and six months gestation. This pattern of mid-gestation abortion is distinct from other diagnosed causes of infectious abortion in dairy cattle which tend to occur later in gestation. In dogs, *Neospora* infection causes neuromuscular paralysis. Identification of carrier animals is based upon detection of specific antibody with serological tests while diagnosis of abortions is based upon microscopic examination of the fetus and immunohistochemistry.

Neospora caninum Antibody Test Kit, cELISA					
Format	Species	Sample	Sensitivity	Specificity	Assay Time
cELISA	multiple	serum	96%	99%	115 minutes

USDA Licensed Product

Catalog No.	Configuration	Tests
280-2	2 stripwell plates	184
280-5 [†]	5 stripwell plates	460

[†] Custom orders only, with a minimum purchase of 50 kits. Three months lead time required.

Anexo 3: Certificado de análisis de IFI



VMRD

PO Box 502, Pullman, WA 99163 USA

Ingreso: 2010-07

Telephone: 509-334-5815
Fax: 509-332-5356
E-mail: vmrd@vmrd.com
Web site: <http://www.vmrd.com>

Certificate of Analysis

NEOSPORA CANINUM

FA Substrate Slide

CATALOG NO.: SLD-IFA-NC

SIZE: 12 Well

LOT: P090429-004

EXPIRATION: 28 May 2011

AGENT: *Neospora caninum*

STRAIN: NC-1

CELL CULTURE SUBSTRATE: Vero cells



DESCRIPTION: Slides contain *Neospora caninum*-infected Vero cultures spotted on the surface of teflon-masked slides. The majority of the protozoa are extracellular. They are supplied fixed and unstained in moisture-free pouches.

QUALITY CONTROL METHOD: Indirect FA using VMRD Inc. *N. caninum* Bovine Positive Control (211-P-NC-BOV), *N. caninum* Canine Positive Control (211-P-NC-CAN), *N. caninum* Bovine Negative Control (211-N-NC-BOV), *N. caninum* Canine Negative Control (211-N-NC-CAN), Anti-Bovine IgG_{1,2} FITC Conjugate (020-1 or 020-10), Anti-Canine IgG FITC Conjugate (035-1 or 035-10).

Specific Reaction: 4+ and no background with both Bovine and Canine positive controls.
Negative and no background with Bovine and Canine negative controls.
Organisms per high power field are too numerous to count.

Other Comments: NA

PATTERN OF FLUORESCENCE: Organisms with bright diffuse or peripheral fluorescence.

INTERPRETATION OF RESULTS: Bovine sera should be screened at 1:200 for IgG. Canine sera should be screened at 1:50 for IgG. Diffuse or peripheral staining is considered positive. As is the case with *Toxoplasma*, apical (polar) staining is not considered positive.

INTENDED USE: Generally used for Indirect FA to detect antibody to *Neospora caninum* but may also be used as a positive and negative control substrate slide for Direct FA conjugates when applicable, and to differentiate antibody class (IgG or IgM) with suitable quality fluoresceinated second antibody conjugate

STORAGE: Store sealed in foil pouch at -20°C. Avoid self-defrosting freezers.

REFERENCES: NA

FOR *IN VITRO* LABORATORY USE ONLY.

WARRANTY: VMRD, Inc. warrants that this product is as described in the quantity and contents stated on the label at the time of delivery to the customer. NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE MADE BEYOND THE LABEL DESCRIPTION, INCLUDING WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR USE. Remedy is limited to replacement of the product or refund of the purchase price. VMRD, Inc. is not liable for property damage, personal injury, or economic loss caused by the product. The information listed in this information sheet is provided for reference only, and should not be substituted for the user's own incoming material quality control.

H:\Quality VMRD\QC\CoFA\8-, 10-, 12-well Slides\Neospora caninum\NC 12 well slide SLD-IFA-NC P090429-004 110528.doc
25 June 2009

RECOMMENDED STAINING PROCEDURE FOR INDIRECT FA:

1. Warm slide to room temperature before removing from foil pouch.
2. Place 50 µl diluted serum on the designated wells. Dilute serum in serum diluting buffer, pH 7.2 (catalog no. 210-93-SB).
3. Incubate slide in humid chamber at 37°C for 30 minutes.
4. Using a wash bottle, gently rinse slide briefly in FA rinse buffer, pH 9.0 (catalog no. 210-90-RB) and then soak for 10 minutes in FA rinse buffer, pH 9.0.
5. Drain slide and dry around wells by pressing blotter (included in pouch) to front surface. Place 50 µl labeled anti-IgG or IgM on the wells.
6. Incubate as in step 3.
7. Rinse as in step 4.
8. Drain slide and dry back and edges with a paper towel. Do not allow stained surface to dry. Do not rinse with water.
9. Mount with mounting fluid [glycerol/FA rinse buffer, pH 9.0, (50/50)] (catalog no. 210-92-MF) and view with good quality fluorescence microscope at 100X-250X. Confirmation may be made at 400X.

RECOMMENDED STAINING PROCEDURE FOR DIRECT FA:

1. Warm slide to room temperature before removing from foil pouch.
2. Place 50 µl of direct FA conjugate on the designated wells.
3. Incubate slide in humid chamber at 37°C for 30 minutes.
4. Using a wash bottle, gently rinse slide briefly in FA rinse buffer, pH 9.0 (catalog no. 210-90-RB) and then soak for 10 minutes in FA rinse buffer, pH 9.0.
5. Drain slide and dry back and edges with a paper towel. Do not allow stained surface to dry. Do not rinse with water.
6. Mount with mounting fluid [glycerol/FA rinse buffer, pH 9.0, (50/50)] (catalog no. 210-92-MF) and view with good quality fluorescence microscope at 100X-250X. Confirmation may be at 400X.

SERUM DILUTING BUFFER (pH 7.2):*

- Na₂HPO₄ 1.19 gm
- NaH₂PO₄ 0.22 gm
- NaCl 8.55 gm
- BSA 10.0 gm
- DI/dH₂O Q.S. to 1 liter

* This recipe makes 1 liter. If you need less, adjust recipe accordingly. Store at 2-7°C. Add 0.09% NaN₃ if diluted serum is not going to be used within one week.

4X FA RINSE BUFFER (pH 9.0):

- Na₂CO₃ 11.4 gm
- NaHCO₃ 33.6 gm
- NaCl 8.5 gm
- DI/dH₂O Q.S. to 1 liter

Final pH should be 9.0-9.5. This is a 4X concentrate and should be diluted 1:4 with DI/distilled water for use as a working buffer. Keep in a tightly stoppered container at room temperature. MOUNTING FLUID is made by mixing glycerol and FA rinse buffer, pH 9.0, in equal proportions.

Anexo 4: Certificado de análisis de fluido de montaje

Ingreso : 2011-05-06



VMRD

PO Box 502, Pullman, WA 99163 USA

Telephone: 509-334-5815

Fax: 509-332-5356

E-mail: vmrd@vmrd.com

Web site: <http://www.vmrd.com>

Certificate of Analysis

FA MOUNTING FLUID

CATALOG NO.: FAMF-10ML

SIZE: 10 ml

LOT: P110201-004

EXPIRATION: 15 February 2013

DESCRIPTION: FA Mounting Fluid pH 9.0-9.6 is made from a 50/50 mix of FA Rinse Buffer and glycerol.

QUALITY CONTROL METHOD: Compared to previous lot of Mounting Fluid by direct FA using VMRD, Inc. PI-3 2 well slides (catalog no. SLD-FAC-PI3) and PI-3 Direct FA FITC Conjugate (catalog no. CJ-F-PI-3-10ML).

Specific Reaction: There is no difference between the reference and the QC lot and there is no background.

Other Comments: NA

PATTERN OF FLUORESCENCE: The pattern of fluorescence will vary depending on what system was used.

INTENDED USE: FA Mounting Fluid is applied to FA substrate and control slides beneath the cover slip prior to viewing with fluorescence microscope.

STORAGE: FA Mounting Fluid should be stored at room temperature.

REFERENCES: NA

FOR *IN VITRO* LABORATORY USE ONLY.

WARRANTY: VMRD, Inc. warrants that this product is as described in the quantity and contents stated on the label at the time of delivery to the customer. NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE MADE BEYOND THE LABEL DESCRIPTION, INCLUDING WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR USE. Remedy is limited to replacement of the product or refund of the purchase price. VMRD, Inc. is not liable for property damage, personal injury, or economic loss caused by the product. The information listed in this information sheet is provided for reference only, and should not be substituted for the user's own incoming material quality control.

H:\Quality VMRD\QC\CofA\Buffers\Mounting Fluid\Mounting Fluid FAMF-10ML P110201-004 130215.docx
12 April 2011

Anexo 5: Procedimientos para la técnica de ELISA competitiva

Materiales

- 343 Muestras
- 2 Recipientes de plástico
- 1 Pipeta multicanal
- 1 Pipetas serológicas
- 1 Rollo de Papel absorbente
- 1 Funda de Puntas de 100ul
- 1 Funda de Puntas de 1000ul

Reactivos (Kit ELISA)

- 5 Placas impregnadas con antígeno
- Control Positivo (1 botella de 3.6ml)
- Control Negativo (1 botella de 3.6ml)
- Conjugado Antibody-Peroxidase (100X) (1 botella de 500ul)
- Buffer Diluyente Conjugado (1 botella de 60ml)
- Solución de Lavado Concentrado (10X) (2 botellas de 120ml cada una)
- Solución de Substrato (1 botella de 60ml)
- Solución Stop (1 botella de 60ml)

Ilustración 13: Materiales (ELISA)



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

TECNICA ELISA

- ✓ Aclimatar reactivos, controles (Positivo y Negativo), y las muestras a ser procesadas.
- ✓ Colocar 50 ul de controles (Positivo y Negativo) y de los sueros en la placa de microelisa, Agitar y cubrir con papel aluminio e incubar la placa 1 hora a temperatura ambiente (21-25°C).

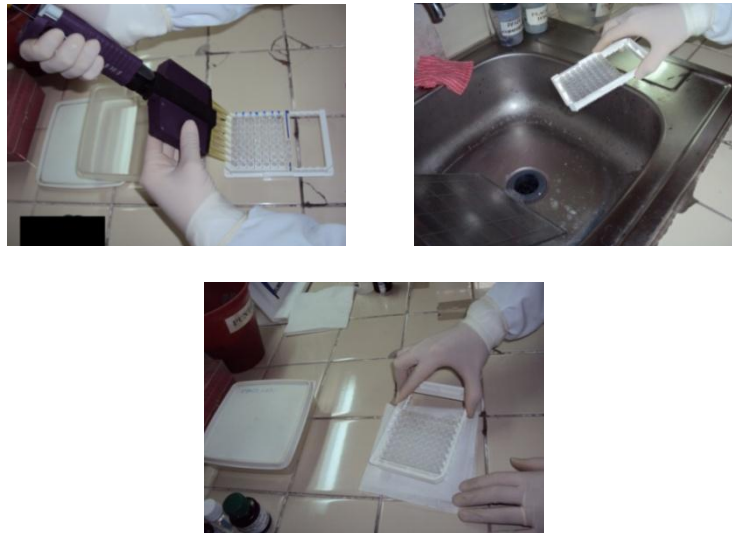
Ilustración 14: Colocación de sueros en la Microaplaca e incubación



Fuente:(Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Después de la 1 hora de incubación lavar por 3 veces con la solución de lavado, 290ul por cada pocillo.

Ilustración 15: Lavado



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Conjugado: Adicionar 50ul del diluido del conjugado por cada pocillo e incubar la placa por 20 minutos a temperatura ambiente (21-25C).

Ilustración 16: Conjugado



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Después de la incubación de 20 minutos repetir el lavado (Ilustración 8).
- ✓ Sustrato: Colocar 50ul de la solución de sustrato, agitar, cubrir e incubar por 20 minutos.

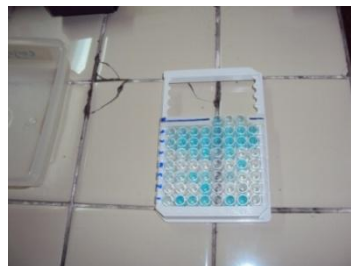
Ilustración 17: Sustrato



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Colocar 50ul de la solución Stop.

Ilustración 18: Solución de Parada



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Inmediatamente luego de adicionar la solución Stop leer en un filtro de 620 nm.

Ilustración 19: Lector de ELISA



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Imprimir las densidades ópticas y proceder a realizar los cálculos.

Validación de la prueba

- Control Negativo: $DO \geq 0.30$ y < 2.50
- Control Positivo: $> 30\%$ Inhibición

Cálculo para el Porcentaje de Inhibición (%I)

$$\%I = 100 - \frac{DOMuestra \times 100}{DOControlnegativo}$$

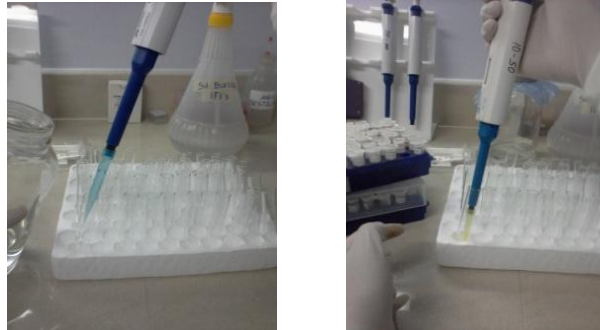
Los criterios de Interpretación de la prueba de *Neospora caninum* según el fabricante son:

- Positivo: $\% I \geq 30$
- Negativo: $\% I < 30$

TECNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

- ✓ Diluir 1:200 los sueros con el diluyente buffer pH 7.2 (1990ul del diluyente + 10 ul del suero)

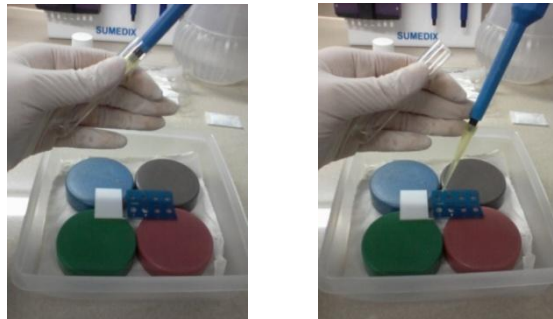
Ilustración 21: Dilución de muestras



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Colocar 20 ul del suero diluido en cada pocillo de la placa e incubar 30 minutos en cámara húmeda a 37°C.

Ilustración 22: IFI



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Lavar la placa con un dispensador que contenga FA Rinse buffer pH 9.0 y sumergir la placa por 10 minutos en el FA Rinse buffer pH 9.0

Ilustración 23: Lavado de la placa



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Después de los 10 minutos secar los bordes de los pocillos.

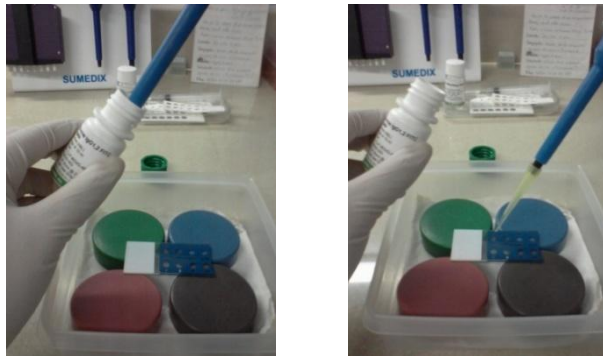
Ilustración 24: Secado



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Colocar 20 ul anti-Ig G o Ig-M e incubar por 30 minutos en cámara húmeda a 37°C.

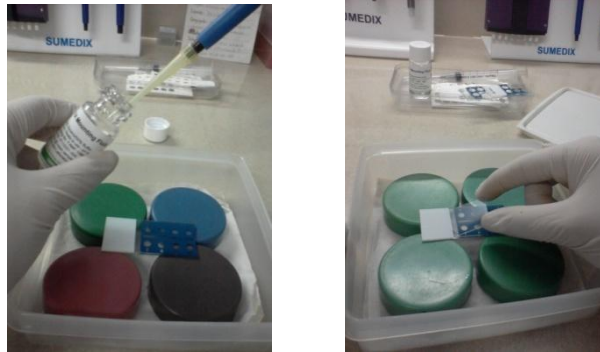
Ilustración 25: Colocar anti-Ig G o Ig M



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Lavar la placa con un dispensador que contenga FA Rinse buffer pH 9.0 y sumergir la placa por 10 minutos en el FA Rinse buffer pH 9.0 (Ilustración 16).
- ✓ Colocar la solución de montaje y colocar un cubreobjetos.

Ilustración 26: Montaje



Fuente: (Daniela Escobar, 2010)

- ✓ Leer en un microscopio de fluorescencia con el lente de 200X.

Ilustración 27: Microscopio de Fluorescencia



Interpretación de Resultados

- Positivo: células fluorescentes.
- Negativo: células no fluorescentes.

Bibliografía

Anderson, M. L., C. W. Palmer, M. C. Thurmond, J. P. Picanso, P. C. Blanchard, R. E. Breitmeyer, A. W. Layton, M. M. McAllister, B. Daft, H. Kinde, D. H. Read, J. P. Dubey, P. A. Conrad, and B. C. Barr. 1995. Evaluation of abortion in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J.Am.Vet.Med.Asoc.* 207:1206-1210. 2.- Atkinson, R., P. A. Harper, M. P. Reichel, and J. T. Ellis. 2000. Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol. Today.* 16:110-114.

Andreotti, R. 2001. Neosporosis: un posible problema reproductivo para el ganado bovino. EMBRAPA Campo Grande-Brasil. www.cnpqg.embrapa.br

Andrianarivo, A. G., Barr, B. C., Anderson, M. L., Rowe, J. D., Packham, A. E., Sverlow, K. W., Conrad, P. A. (2001). Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*. *Parasitol.Res.* 87, 817-825.

Appleford, P., Smith, J. E. (2000). Strain and stage specific variation in *Toxoplasma gondii* antigens. *Int. J. Parasitol.* 30, 1187-1191.

Atkinson, R. A., Ryce, C., Miller, C. M., Balu, S., Harper, P. A., Ellis, J. T. (2001). Isolation of *Neospora caninum* genes detected during a chronic murine infection. *Int.J.Parasitol.* 31, 67-71.

Atkinson, R., Harper, P. A., Reichel, M. P., Ellis, J. T. (2000b). Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitol.Today* 16, 110-114.

Barber, J. S., Gasser, R. B., Ellis, J., Reichel, M. P., McMillan, D., Trees, A. J. (1997). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations. *J.Parasitol.* 83, 1056-1058.

Barr, B. C., Anderson, M. L., Dubey, J. P., Conrad, P. A. (1991a). *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet.Pathol.* 28, 110-116.

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, 611-613.

Barr, B. C., Conrad, P. A., Dubey, J. P., Anderson, M. L. (1991b). *Neospora*-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J.Vet.Diagn.Invest* 3, 39-46.

Barta, J., & Dubey, J. (1992). Characterisation of anti-*Neospora caninum* hyperimmune rabbit serum by western blot analysis and immunoelectron microscopy. En *Parasitol* (págs. 78, 689-694).

Baszler, T. V., Adams, S., Vander-Schalie, J., Mathison, B. A., Kostovic, M. (2001). Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *J.Clin.Microbiol.* 39, 3851-3857.

Baszler, T. V., M. T. Long, T. F. McElwain, and B. A. Mathison. 1999. Interferon-gamma and interleukin-12 mediate protection to acute *Neospora caninum* infection in BALB/c mice. *Int. J. Parasitol.* 29:1635-1646.

Bjerkas. (1994). Identification and characterisation de *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. En *Clin. Diagn. Lab. Immunol* (págs. 214-221). et al.

Bjerkas, D. &. (1991). Descripción de *Neospora caninum* .

Björkman, C., McAllister, M. M., Frossling, J., Naslund, 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, 3-7.

Björkman, C., O. Johansson, S. Stenlund, O. J. M. Holmdahl, and A. Uggla. 1996. *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Asoc.* 208:1441-1444.

Björkman, C., and A. Uggla. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 29:1497-1507.

Brener, J. 2000. Los perros son portadores del *Neospora caninum*. Revista Hereford. Iowa-EE.UU. www.imperiorural.com.ar

CAMPERO, C. 2002. Perdidas provocadas por *Neospora caninum* en bovinos. Grupo de sanidad animal, INTA. Balcarce-Argentina. ccampero@balcarce.inta.gov.ar

Campillo, C. D. (1999). En *Parasitología Veterinaria* (págs. 330-332, 668-669). Madrid: Mc Graw Hill Interamericana.

Canada, N., Meireles, C. S., Rocha, A., Sousa, S., Thompson, G., Dubey, J. P., Romand, S., Thulliez, P., Correia da Costa, J. M. (2002). First Portuguese isolate of *Neospora caninum* from an aborted fetus from a dairy herd with endemic neosporosis. *Vet.Parasitol.* 110, 11-15.

Cebrián, L., Barberán, M., Ramos, J., Senent, J. (1998). Detección de animales infectados por *Neospora* mediante inmunofluorescencia indirecta y su aplicación al control de la enfermedad. *Libro de Ponencias V Congreso Internacional de Medicina Bovina A.N.E.M.B.E.* Sitges, Mayo, 201-202.

Cotrino, V. 2003. Neosporosis: enfermedad emergente. Director Científico Laboratorio Médico Veterinario. Bogotá-Colombia. www.lmvlt.com

D.P. Moore, A. O., & M.C. Venturini, C. C. (2005). Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. *Revista Argentina de Microbiología* , 217-228.

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.

Dijkstra, T., Barkema, H. W., Eysker, M., Wouda, W. (2001a). Evidence of postnatal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int. J. Parasitol.* 31, 209-215.

Del Campo, J. (s.f.). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172003000200008. Recuperado el 30 de Septiembre de 2009

Dra. Andrianarivo, D. P. (Compositor). (2003). Respuesta inmune del ganado bovino contra *Neospora caninum*. USA.

Dubey, J. C. (1989). *Newly recognized fatal protozoan disease of dogs* .

Dubey, J. y. (1996). A review of *Neospora caninum*. *Veterinary parasitology*, (págs. 1-59).

Dubey, J. P. (1999a). Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 214, 1160-1163.

Dubey, J. P. (1999b). Neosporosis--the first decade of research. *Int.J.Parasitol.* 29, 1485-1488.

Dubey, J. P. (1999c). Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet.Parasitol.* 84, 349-367.

E., Lozada. (2004). Tesis del Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador. *Determinación de la presencia de anticuerpos a Neospora caninum en hatos lecheros de la Sierra Norte del Ecuador* . Quito, Pichincha, Ecuador.

Escobar, D., & Karla, V. (2011). *Comparación de dos técnicas serológicas, inmunofluorescencia indirecta y ELISA para la determinación de Neospora caninum en las provincias de Pichincha, Bolívar y Santo Domingo de Los Tsáchilas.* Quito.

French, N. P., Clancy, D., Davison, H. C., Trees, A. J. (1999). Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. *Int.J.Parasitol.* 29, 1691-1704.

García, G. Á. (2003). *Identificación y Caracterización de Antígenos de "Neospora caninum" con intereses inmunodiagnósticos en bovinos* . Madrid.

García, L., & Torres, P. (Febrero-Julio de 2008). Proyecto de Investigación. *Seroprevalencia de enfermedades infecciosas bovinas: leptospirosis, brucelosis, neosporosis y leucosis en un mínimo de tres haciendas de cada una de las provincias de Pichincha, Santo Domingo y Bolívar.* Quito, Pichincha, Ecuador.

Gondim, L. F., I. F. Sartor, M. Hasegawa, and I. Yamane. 1999. Seroprevalence of *Neosporacanimum* in dairy cattle in Bahia, Brazil. *Vet. Parasitol.* 86:71-75.

Hay, W. H., Shell, L. G., Lindsay, D. S., Dubey, J. P. (1990). Diagnosis and treatment of *Neospora caninum* infection in a dog. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 197, 87-89.

Hemphill, A., N. Fuchs, S. Sonda, and A. Hehl. 1999. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 29:1175-1188.

Henry, J. B. (2007). *Laboratorio*. Madrid España: Marban Libros.
[http://www.hipra.com/castellano/patologiasAmp.asp?idNew=240&topico=394119.\(s.f.\)](http://www.hipra.com/castellano/patologiasAmp.asp?idNew=240&topico=394119.(s.f.)) Recuperado el 29 de Septiembre de 2009

Howe, D. K., and L. D. Sibley. 1999. Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and, *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* 29:1489-1496.

Jenkins, M. C., J. T. Ellis, S. Liddell, C. Ryce, B. L. Munday, D. A. Morrison, and J.P. Dubey. 1999. The relationship of *Hammondia hainmondi* and *Sarcocystis mucosa* to other heteroxenous cyst-forming coccidia as inferred by phylogenetic analysis of the 18S SSU ribosomal DNA sequence. *Parasitology*. 119(Aug Pt 2):135-142.

Intervet http://www.intervet.com.ec/productos/bovilis_neoguard/020_informacion_del_producto.asp.

Jorge del Campo S, A. C. (s.f.).

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S1609-91172003000200008. Recuperado el 30 de Septiembre de 2009

Lértora, W., A., B., & Catuogno, M. (s.f.).<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3491/>. Recuperado el 28 de Septiembre de 2009

Liddell, S., M. C. Jenkins, C. M. Collica, and J. P. Dubey. 1999. Prevention of vertical transfer of *Neospora caninum* in BALB/c mice by vaccination. *J. Parasitol.* 85:1072-1075.

Lindsay, D. S., S. J. Upton, and J. P. Dubey. 1999. A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int. J. Parasitol.* 29:1521-1523.

Mainar-Jaime, R. C., M. C. Thunnond, B. Berzal-Herranz, and S. K. Hietala. 1999. Seroprevalence of *Neospora caninum* and abortion in dairy cows in Northern Spain. *Vet. Rec.* 145:72-75.

McAllister, M. M., E. M. Huffman, S. K. Hietala, P. A. Conrad, M. L. Anderson, and D. Salman. 1996. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8:355-357.

Manuel, s. J. (12 de Abril de 2004).

<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?!Cve=42336306>. Recuperado el 30 de Octubre de 2010

Moore, D. O. (Diciembre de 2001).

http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/sanidad/enf_repro/MooreNcaninum.PDF. Recuperado el 27 de Septiembre de 2010

Moore, D. 2002. Evaluación de anticuerpos ANTI-*Neospora caninum* en ciervos colorados. Grupo de sanidad animal, INTA. Balcarce-Argentina. ccampero@balcarce.inta.gov.ar

Murray. (2010). *Patología veterinaria*. Recuperado el 2011, de <http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET1-2005/PDF/Mepavet08.pdf>

Ould-Amrouche, A., F. Klein, C. Osdoit, H. O. Mohammed, A. Touratier, M. Sanaa, and J. P. Mialot. 1999. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Nonnandy, France. *Vet. Res.* 30:531-538.

- Pare, J., M. C. Thurmond, and S. K. Hietala. 1997.** *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83:8287.
- Patitucci A, P. M., M. P., & M., R. (2001).** Neosporosis canina: presencia de anticuerpos sericos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. Chile.
- Patitucci, A. 2004.** Prevalencia de anticuerpos séricos contra *Neosporacanicum* en dos rebaños lecheros de la IX Región de Chile. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco. Temuco-Chile. www.scielo.cl
- Quintanilla-Gozaolo, A., J. Pereira-Bueno, E. Tabares, E. A. Innes, R. GonzalezPaniello, and L. M. Ortega-Mora. 1999.** Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int. J. Parasitol.* 29:1201-1208. 24.- Reichel, M. P. 1998. Prevalence of *Neospora* antibodies in New Zealand dairy cattle and dogs. *New Zealand Vet. J.* 46:38.
- Rivera, H. 2003.** *Neospora caninum* y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del valle de Lima. Facultad de Medicina Veterinaria Universidad Nacional Mayor San Marcos. Lima-Perú. www.visionveterinaria.com
- Rojas, M. 2003.** Neosporosis Canina. Facultad de Medicina Veterinaria Universidad Nacional Mayor San Marcos. Lima-Perú. www.visionveterinaria.com
- Thrusfield. (1995).** *Epidemiología Veterinaria.* Gran Bretaña.
- Valentini, I. E. (s.f.).** http://rafaela.inta.gov.ar/productores97_98/p91.htm. Recuperado el 12 de Octubre de 2009
- Venturini, M. C., L. Venturini, D. Bacigalupe, M. Machuca, I. E. Echaide, W. Basso, J.M. Unzaga, C. Di Lorenzo, A. A. Guglielmone, M. C. Jenkins, and J. P. Dubey. 1999.** *Neospora caninum* infectious in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 29:1705-1708.
- Zambrano, J. 2003.** Evaluación serológica de *Neospora caninum* en bovinos en Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia Universidad Nacional de Colombia. www.encolombia.com