

16 - Control de la neosporosis en un tambo comercial y primer aislamiento de *Neospora caninum* en bov

Vet. Arg. ? Vol. XXXIII ? N° 343 ? Noviembre 2016.

Lagomarsino H1; Campero L2,3; Cano D4; Armendano J5; Massola L1; Hecker Y2; García B1; Gual I2; Bracho V1; Pardini L2,3; Leunda M4; Pereyra S4; Lischinsky L4; Fiorani F2; Rambeaud M2; Moré G2,3;

Este trabajo recibió el premio de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria y el laboratorio Biogénesis Bagó SA al mejor trabajo de adopción de tecnología para una mayor eficiencia productiva en ganadería intensiva, extensiva y tambos que aborde aspectos sanitarios, reproductivos o de manejo con impacto en la producción bovina realizado en Argentina.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue controlar las pérdidas reproductivas ocasionadas por la neosporosis bovina en un tambo comercial ubicado en el sudeste de la provincia de Córdoba. Las vacas y vaquillonas eran de cruce Jersey-Holando Argentino en un sistema de base pastoril con manejo reproductivo biestacionado. La seroprevalencia inicial de *N. caninum* era del 18,9% y el porcentaje anual de abortos general era del 10% en 2564 animales. Como prueba serológica se utilizó inmunofluorescencia indirecta estableciendo la asociación entre seropositividad y ocurrencia de abortos. Se caracterizaron las vías de transmisión para establecer las medidas de control. Gradualmente se eliminaron las hembras seropositivas. Además, las vacas y vaquillonas lecheras seropositivas se inseminaron con semen de raza Hereford para incrementar la producción de kilogramos de carne. Se utilizó la primera cepa de *N. caninum* aislada desde un bovino como inmunógeno experimental en hembras naturalmente seropositivas. Hubo asociación estadística significativa entre seropositividad y el evento aborto en vacas y vaquillonas; siendo mayor para la categoría vaquillona. Una vaca seropositiva tuvo aproximadamente el doble de posibilidades de abortar que una vaca seronegativa (OR=1,9; IC95%: 1,2-2,3). Una vaquillona positiva tuvo cerca de 5 veces más posibilidades de sufrir un aborto que su contraparte seronegativa (OR=5,1; IC95%: 2,7-9,5). Interesantemente, se observaron diferencias significativas en el riesgo de abortar cuando se considera la categoría; es decir, una vaquillona seropositiva tuvo más del doble de posibilidades de abortar que una vaca seropositiva (OR=2,4; IC95%: 1,3-4,3). Considerando el muestreo de las madres y el sangrado pre-calostroal se identificaron 9 animales con riesgo de transmisión vertical y 45 en riesgo de transmisión horizontal, respectivamente. La proporción de terneros infectados por

cada una de las vías estudiadas no difirió significativamente ($P>0,05$) debiendo considerarse que si bien la vía de transmisión horizontal fue menos eficiente, la proporción de animales en riesgo fue significativamente mayor ($P<0,05$). Aunque se observaron diferencias significativas en la seroprevalencia y el porcentaje de aborto general a lo largo de los años para la categoría vaquillona ($P<0,05$); dichas diferencias no se observaron en la categoría vaca ($P>0,05$). La caracterización en la dinámica de anticuerpos e inocuidad luego de inocular la cepa autóctona aislada en animales crónicamente infectados demostró una interacción significativa entre tiempo y tratamiento en ambas categorías (vaca y vaquillona). Antes de la inoculación no se detectaron diferencias en el título de anticuerpos en los grupos tratados y placebo ($P>0,05$). Sin embargo, luego de inocular los parásitos vivos se observó un aumento significativo en el título de anticuerpos ($P<0,05$). Los animales actualmente se encuentran en su 6º mes de gestación habiéndose registrado sólo un aborto en el grupo placebo. Es relevante hacer un diagnóstico adecuado de la situación sanitaria en el establecimiento respecto a la neosporosis bovina, comenzando por determinar su asociación con la ocurrencia de abortos. Aunque en este establecimiento se demostró una alta eficacia en la transmisión vertical de la neosporosis es importante considerar que durante el estudio longitudinal se demostró una proporción de animales expuestos (transmisión horizontal) similar a los que se habían infectado congénitamente (transmisión vertical). Se disminuyó significativamente la seroprevalencia de neosporosis y los abortos en vaquillonas mediante identificación y eliminación gradual de animales seropositivos y evitando dejar como reposición hijas de madres positivas. La implementación de la IA con semen de raza para carne es una herramienta interesante permitiendo que una vaca lechera infectada siga en producción (siempre que no sufra un aborto) dejando una descendencia que no ingresará al tambo y incrementando la producción de carne con un precio más competitivo. La nueva cepa (NC-Argentina LP1) fue utilizada como autovacuna en el mismo establecimiento donde fue aislada.

1 Actividad Privada, Venado Tuerto CP S2600, Santa Fe, Argentina

2 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), CP C1033AAJ, Buenos Aires, Argentina

3 Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Argentina

4 Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

5 Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP), CP 7600, Argentina

6 Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires CP 7000, Argentina.

Introducción

Actualidad del sector lechero y parámetros reproductivos

La producción de leche, particularmente la realizada por pequeños y medianos productores tamberos, se encuentra bajo circunstancias muy exigentes y competitivas. Necesitan ser muy eficientes en cada eslabón del ciclo productivo si desean lograr una proyección de crecimiento en el número de vacas en ordeño y diluir los costos fijos. Es más, en muchas situaciones el mantenimiento del número de vacas en ordeño se ve comprometido con la propia producción de recrias a causa de un alto porcentaje de pérdidas reproductivas.

Mantener adecuados parámetros reproductivos implica no sólo llevar adelante medidas eficientes de manejo sino también establecer un estatus sanitario conocido y controlado. Además, de las pérdidas económicas directas atribuidas a los abortos (cualquiera sea su origen), las pérdidas reproductivas limitan un crecimiento del rodeo sostenido a lo largo de los años. En un tambo sanitariamente controlado se pueden lograr tasas de crecimiento de un 2-3% anual siempre y cuando la tasa de abortos no supere el 8%.

Si bien existen otras causas infecciosas que provocan pérdidas reproductivas (virus, bacterias, hongos, protozoarios), las infecciones por *Neospora caninum* son frecuentes siendo las medidas para su control poco eficientes y difíciles de implementar. El paso inicial es confirmar la asociación de los episodios de aborto con las infecciones por *N. caninum*, establecer la seroprevalencia general en el rodeo por categorías, y establecer cuáles son las principales vías de infección (Dubey y col., 2007). La ausencia de tratamiento ni vacunas, necesariamente implica la aplicación de estrategias integradas de manejo que deben ser evaluadas según practicidad y beneficios económicos.

Antecedentes sobre el tema

N. caninum es considerado como la principal causa de aborto en ganado lechero (Dubey y col., 2007, 2011). Los hospedadores definitivos reconocidos en la actualidad son el perro doméstico, el dingo, el lobo y el coyote. Los hospedadores definitivos adquieren la infección al ingerir tejidos (placentas y fetos) de hospedadores intermediarios conteniendo quistes (Dubey y col., 2007). La pared de los quistes es degradada por los jugos gástricos liberando las formas parasitarias que iniciarán los estadios enteroepiteliales (Kul y col., 2015). Luego de realizar una fase asexual y sexual en el intestino, los ooquistes son eliminados en las heces del hospedador definitivo. La ingestión de estos ooquistes es la única vía de transmisión horizontal demostrada en hospedadores intermediarios cuando los ingieren por vía oral (Dubey et al 2011). Los esporozoítos de los ooquistes son liberados en el aparato gastrointestinal del hospedador intermediario y vía sanguínea y linfática acceden a todos los tejidos, llegando a formar quistes solo en

sistema nervioso central (SNC) y tejido muscular. Una vaca infectada transmite muy eficientemente la enfermedad a su feto gestante. Esta transmisión puede ocurrir tanto en una vaca que se infecta recientemente, o en una vaca crónicamente infectada, al reactivarse los quistes latentes. De esta manera la enfermedad se mantiene en el rodeo.

En los rumiantes no hay transferencia de anticuerpos desde la madre hacia el feto por vía transplacentaria, por lo tanto la detección de anticuerpos específicos en suero precalostrado del ternero indica la síntesis de anticuerpos por parte del feto debido a una infección intrauterina. Por lo tanto esta herramienta sirve para detectar transmisión vertical de la neosporosis, determinando la prevalencia en las vacas y su progenie antes de la ingesta de calostro. Además, comparándola prevalencia según la categoría o edad permitirá también inferir la importancia de la transmisión horizontal de la enfermedad. La dinámica de anticuerpos a lo largo de la gestación ha sido caracterizada en vaquillonas Holando crónicamente infectadas con *N. caninum* (Moore y col., 2005). Se describieron altos títulos séricos durante el último tercio de la gestación los cuales descienden semanas luego del parto.

La presentación de los abortos provocados por una infección con *N. caninum* tiene dos comportamientos distintos: un brote de abortos concentrados en un periodo de tiempo limitado (forma epidémica) generalmente se asocia a la transmisión horizontal (McAllister y col., 2000). Mientras que la forma endémica generalmente es consecuencia de una infección anterior y puede estar precedida por un patrón epidémico caracterizándose por la prolongación en el tiempo de abortos esporádicos (Dubey y col., 2007). Diversos investigadores señalan que en los años siguientes a un brote epidémico de abortos, los rodeos afectados pueden experimentar abortos enzoóticos (Dubey y col., 2007).

Neosporosis bovina en Argentina

En Argentina, los trabajos primeros relevamientos seroepidemiológicos de neosporosis en ganado para leche y carne determinaron la presencia de anticuerpos específicos por inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Venturini y col., 1995). Otros estudios en las provincias de Santa Fe y Córdoba demostraron prevalencias del 15 al 27,5% en 320 bovinos lecheros, siendo positivos los 8 rodeos en estudio (Echaide y col., 2002). En fetos provenientes de frigoríficos se encontró que el 24% y el 4,5% de los especímenes provenientes de rodeos de leche y carne respectivamente presentaban anticuerpos específicos (Venturini y col., 1999). En un estudio realizado en un tambo del oeste de la provincia de Buenos Aires, se detectó una prevalencia del 80,9% en vacas y 30% en terneros precalostrados de un total de 173 vacas y partos evaluados. En la provincia de La Pampa, Fort y col. (2015) determinaron una prevalencia de 9,6% de 4334 sueros bovinos analizados

siendo mayor la seroprevalencia en vacas de tambo (20,3%) en relación a las de cría (7%), en coincidencia con lo reportado en estudios previos. Estos estudios demostraron la alta seroprevalencia de la neosporosis en los sistemas de producción de leche, y la elevada tasa de transmisión vertical de la enfermedad (Moré y col., 2009).

En el año 2008 se detectó que el 10% de 666 fetos abortados analizados fueron producidos por infecciones con *N. caninum*, confirmando lesiones histopatológicas compatibles y detectando anticuerpos específicos mediante IFI (fluido fetal 1:25) y/o la presencia del parásito mediante inmunohistoquímica (IHQ) y/o nested-PCR (Moore y col., 2008).

Posteriormente, Moore y col. (2009) demostraron que la prevalencia hallada en bovinos (IFI 1:200) fue diferente de acuerdo con la categoría analizada. En las categorías vaquillona de reposición y vaca de rodeos para carne las prevalencias fueron 2,6% (n = 265) y 17,3% (n = 1190), respectivamente. En el ganado lechero se observó una prevalencia en las vaquillonas de reemplazo del 18,8% (n = 2501) y en vacas en ordeño del 39,8% (n = 291). Moré y col. (2009) evidenciaron seroconversión en 9/19 terneros seronegativos precalostrales al ser reevaluados a los 7 meses de vida (IFI 1:25). Todos estos resultados demuestran la importancia de la transmisión horizontal de la enfermedad.

Existe un limitado número de aislamientos de *N. caninum* a nivel mundial, principalmente debido a la dificultades operativas en el pasaje desde el tejido infectado al crecimiento *in vitro* del parásito (Dubey y Schares, 2006). En Argentina, hasta el momento se reportaron 3 aislamientos de *N. caninum* de distintos hospedadores, cuyos patrones moleculares fueron confirmados mediante análisis por microsatélites. El aislamiento NC6- Argentina (Basso y col., 2001) fue logrado a partir de ooquistes hallados en la materia fecal de un perro infectado naturalmente, cuya patogenicidad ha sido caracterizada tanto *in vitro* como *in vivo* en ratones y bovinos (Bacigalupe y col. 2013; Hecker y col., 2013; Dellarupe y col., 2014a; 2014b). Luego, Basso y col. (2014) aislaron *N. caninum* de tejidos de un cervato axis (*Axis axis*) del zoológico de La Plata (NC-Axis) que había muerto a los 14 días de vida con un cuadro clínico de debilidad y ataxia. Como resultado parcial del trabajo aquí presentado, se obtuvo el primer aislamiento de *N. caninum* de origen bovino a partir de un ternero asintomático pero congénitamente infectado, proveniente de un rodeo para leche de la provincia de Córdoba, denominado NC-Argentina LP1 (Campero y col., 2015).

Las pérdidas económicas por abortos atribuidos a *N. caninum* en ganado para leche de la pampa húmeda ha sido estimada en US\$ 33.097.221 (rango US\$

15.622.600?119.349.693) (Moore y col., 2013). La estimación en US\$ 1.415 por aborto, incluyó la pérdida de la preñez, costo de diagnóstico de laboratorio, asistencia profesional, venta de la hembra que sufrió el aborto (ingreso) y compra de una vaquillona preñada para su reposición (Moore y col., 2013). En este contexto, resulta imperioso obtener resultados a partir de estrategias integradas de manejo que permitan limitar las pérdidas reproductivas, productivas y económicas ocasionadas por *N. caninum*.

Medidas de control

Se han propuesto diferentes estrategias de control basadas en la relación costo-beneficio a nivel de rodeo. Si la prevalencia de la enfermedad en un rodeo fuera baja, podría ser más caro tratar de eliminar la enfermedad que convivir con ella (Campero, 2014). No obstante, para aquellos rodeos con prevalencias mayores (>21%), se considera que la vacunación sería la medida más rentable (Reichel y Ellis, 2006). Sin embargo, la única vacuna comercial para *N. caninum* que estuvo disponible en algunos países fue retirada del mercado debido a su variable eficacia (Weston y col., 2012; Reichel y col., 2015). Por lo tanto, hasta el presente, no existen vacunas comerciales disponibles ni tratamientos con medicamentos efectivos para el control de la neosporosis bovina. Por tal razón, el control de la neosporosis se basan exclusivamente en medidas de manejo (Almería y López-Gatius, 2013; Weber y col., 2013; Campero, 2014; Reichel y col., 2015). Se recomienda evitar la transmisión horizontal limitando el acceso de los perros al alimento y agua que consume el ganado bovino para impedir la posible diseminación de ooquistes a través de la materia fecal. También es importante eliminar fetos abortados y placentas para evitar la ingestión de posibles tejidos infectados con *N. caninum* por parte de los hospedadores definitivos. Con respecto a la vía de transmisión vertical, se recomienda realizar la reposición con animales seronegativos y eliminar los animales seropositivos al igual que vacas que sufrieron abortos. No obstante, esta medida solamente es rentable si la seroprevalencia es baja (Campero, 2014).

En este trabajo se muestran los resultados de estrategias integradas de manejo realizadas durante 5 años en un tambo comercial ubicado en el sur de la provincia de Córdoba. Además se describe el primer aislamiento en el país de una nueva cepa de *N. caninum* desde un bovino asintomático crónicamente infectado.

Establecimiento y animales

El estudio se realizó en un tambo con aproximadamente 3000 vacas y vaquillonas cruce Jersey-Holando Argentino en producción ubicado en el sudeste de la provincia de Córdoba (33° 47' S 62° 37' W). La carga promedio anual es de 1,8 vacas totales por hectárea con 80% vacas en ordeño sobre vacas totales. El

sistema es de base pastoril, principalmente compuesto por pasturas de alfalfa y distintos grados de suplementación con silo de pastura, silo de maíz, poroto de soja crudo y maíz partido. El manejo reproductivo es bi-estacionado con servicios en otoño y en primavera. El rodeo es libre de brucelosis y tuberculosis. Otras enfermedades que afectan la reproducción se previenen mediante la aplicación de 2 dosis preservicio de una vacuna comercial contra la Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR), Campylobacteriosis bovina, Leptospirosis, *Histophilus somnus* y Diarrea Vírica Bovina (DVB). Los toros se controlan para enfermedades de transmisión sexual. La seroprevalencia inicial de *N. caninum* era del 18,9% y el porcentaje anual de abortos general era del 10%.

Objetivos

Objetivo general

-Controlar las pérdidas reproductivas ocasionadas por la neosporosis bovina en un tambo comercial.

Objetivos específicos

- 1) Determinar la seroprevalencia de la neosporosis bovina y su asociación con la ocurrencia de abortos en vacas y vaquillonas;
- 2) Caracterizar las vías de transmisión para establecer las medidas de control;
- 3) Disminuir la seroprevalencia y los abortos mediante identificación y eliminación gradual de vacas seropositivas;
- 4) Incrementar la producción de kilogramos de carne a partir de la utilización de semen de raza Hereford en hembras lecheras seropositivas;
- 5) Aislar cepas de *N. caninum*;
- 6) Caracterizar la dinámica de anticuerpos e inocuidad de la cepa autóctona aislada en el mismo establecimiento mediante su inoculación en hembras bovinas crónica infectados.

Tecnologías y prácticas de manejo adoptadas

Se describen las tecnologías y prácticas de manejo generales presentando luego, los procedimientos para cada objetivo específico.

Obtención de muestras y prueba serológica

Las muestras para análisis serológico fueron obtenidas por punción de la vena coccígea. Para la detección de anticuerpos específicos se utilizó la prueba de IFI (Venturini y col., 1999). El antígeno utilizado, pertenece a la cepa NC-1 de *N. caninum*. Se utilizó el conjugado comercial anti-IgG bovina producido en conejo marcado con fluoresceína. Los portaobjetos fueron montados en glicerol y examinados en un microscopio de epifluorescencia.

El seguimiento y la búsqueda de información de cada animal (abortos, edad, condición sanitaria, productividad, etc.) a lo largo de los años se realizó mediante un *software* para gestión de empresas de producción lechera.

Determinar la seroprevalencia de la enfermedad y su asociación con la ocurrencia de abortos.

Las diluciones de los sueros comenzaron desde 1:25 para terneros/as y vaquillonas (Venturini y col., 1999) y 1:100 para vacas multíparas (Rodrigues y col., 2004). El criterio de utilizar diferentes diluciones séricas según la categoría animal se aplicó a los fines de maximizar la sensibilidad de la prueba en la categoría vaquillona.

La proporción inicial de animales seropositivos fue comparada entre categorías empleando el test de Chi cuadrado (Proc. FREQ; SAS Institute Inc.; Cary, NC, USA). Asimismo, la ocurrencia de aborto fue evaluada mediante la utilización de un modelo de regresión logística (Proc. GLIMMIX; SAS Institute Inc.), incluyendo a la categoría (vaca o vaquillona), el estatus serológico (positivo o negativo) y su interacción, como variables explicativas. El nivel de asociación entre las variables estudiadas y la ocurrencia de aborto fue estimada a partir del *odds ratio* (OR) \pm intervalo de confianza al 95% (IC95%). En todos los análisis se empleó un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

Caracterizar las vías de transmisión para establecer las medidas de control

Para el cumplimiento de este objetivo se recolectaron muestras de sangre previa ingesta de calostro de 54 terneros/as mediante punción yugular inmediatamente luego de presenciar el parto. Además se extrajo una muestra de sangre de cada madre inmediatamente luego del parto. Asimismo se realizó un estudio serológico longitudinal de los terneros/as durante 15 meses con 5 extracciones de sangre cada 75 días. Las muestras de suero sanguíneo fueron almacenadas a -20°C hasta el momento del análisis. Para este objetivo, las diluciones de los sueros comenzaron desde 1:25 para todas las categorías animales. Para estudiar las vías de transmisión, se definieron dos poblaciones de riesgo. Los terneros hijos de madres positivas fueron considerados como la población en riesgo de transmisión vertical y aquellos que resultaron negativos al muestreo pre-calostroal fueron considerados como la población en riesgo de transmisión horizontal. Se consideró caso de transmisión vertical a los terneros hijos de madre positiva que resultaron positivos en el muestreo pre-calostroal. Como caso de la transmisión horizontal se contabilizaron a los animales negativos pre-calostroalmente que seroconvirtieron en alguno de los sangrados posteriores.

La eficacia de cada vía de transmisión fue evaluada mediante un modelo de regresión logística, utilizando el estatus serológico de la cría como variable respuesta y la población de riesgo a la que pertenecían como variable explicativa (Proc. LOGISTIC; SAS Institute Inc.). También se consideró la inclusión de las variables categoría de la madre y edad de la cría en el modelo. Por último, sobre el total de crías positivas, se comparó la proporción que había sido contagiada por cada una de las vías estudiadas, utilizando para ello la prueba de Chi cuadrado para igualdad de proporciones (Proc. FREQ; SAS Institute Inc.).

Disminuir la seroprevalencia y los abortos mediante identificación y eliminación gradual de vacas seropositivas;

Considerando los parámetros sanitarios y los resultados obtenidos por serología, se utilizaron la sumatoria de "2 eventos" como criterio para la eliminación de las vacas multíparas, considerando "evento" a: seropositividad a *N. caninum*, aborto; mastitis, lesiones podales, baja producción, pérdida de estado corporal, entre otros. Es decir, toda vaca que tuviese alguna de estas manifestaciones clínicas sumado al hecho de ser seropositiva a *N. caninum* fue vendida para faena.

Además, las vacas o vaquillonas seropositivas fueron inseminadas artificialmente con semen de raza Hereford. De esta manera, las crías de hembras seropositivas no ingresan al sistema de producción de leche y son destinadas a producción de carne.

Para el análisis de la evolución de la seroprevalencia y el porcentaje de abortos se emplearon modelos de regresión logística mixtos (Proc. GLIMMIX; SAS Institute Inc.). Los dos parámetros estudiados fueron analizados en función del año (2011 a 2015), de la categoría (vaca o vaquillona) y su interacción. Cuando fue necesario se empleó el ajuste de Holm-Tukey para los contrastes múltiples *post-hoc*. Se empleó un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

Incrementar la producción de kilogramos de carne a partir de la utilización de semen de raza Hereford en hembras seropositivas;

Como se dijo anteriormente toda vaca o vaquillona seropositiva fue inseminada artificialmente con semen de raza Hereford tratando de incrementar la producción de kilogramos de carne no sólo desde la eficiencia lograda en la crusa sino también por el precio de mercado.

Aislar cepas de *N. caninum*

Los materiales y métodos para el aislamiento de la primera cepa de *N. caninum* desde un ternero congénitamente infectado pero clínicamente normal son aquellos publicados por Campero y col., (2015). Brevemente, se seleccionaron 5 neonatos cruzas Jersey x Holando Argentino de 10 días (identificados como A, B, C, D y E) con alto título serológico precolostral hijos de madres seropositivas. Los hemiencéfalos refrigerados para realizar ensayos *in vivo* e *in vitro* se enviaron al Laboratorio de Inmunoparasitología, Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Cada hemiencéfalo de ternero se homogeneizó, digirió e inoculó en ratones *knock-out* para interferón gamma altamente susceptibles a infecciones por *N. caninum*. La infección en estos ratones se confirmó inicialmente por serología (IFI). Así, los ratones seropositivos fueron eutanasiados mediante dislocación medular y se conservaron los órganos para estudios histopatológicos (HP), IHQ y estudios de biología molecular (PCR). Adicionalmente, se realizó cultivo celular a partir del lavado con solución fisiológica de la cavidad peritoneal de los ratones. Un mL de dicho lavado fue utilizado para infectar botellas de cultivo de 25 cm³ con células VERO. Las botellas se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Semanalmente se realizaron pasajes a células nuevas y una observación diaria del cultivo con un microscopio invertido para detectar la presencia de efecto citopático y/o taquizoítos de *N. caninum*.

El ADN extraído de órganos de ratones infectados y de los taquizoítos del cultivo celular positivos a la PCR fue enviado al Dr. Gereon Schares (Instituto Friedrich Loeffler, Wüsterhausen, Alemania) para la caracterización genética mediante la técnica de tipificación multilocus de secuencias (MSLT) a través de una electroforesis capilar para los microsatélites MS1B, MS3, MS5, MS6A, MS6B, MS7, MS12 y MS21 (Regidor- Cerrillo y col., 2006) y secuenciado para los microsatélites MS2 y MS10, como lo describió Basso y col., 2009; 2010. Las secuencias nucleotídicas de los microsatélites MS2 y MS10 fueron depositados en la base de datos del GenBank con los números de acceso: KJ700414 y KJ700413, respectivamente, denominándose la cepa NC-Argentina LP1.

Todos los animales utilizados en este estudio fueron manejados en acuerdo estricto con las condiciones propuestas por el Comité institucional de cuidado y uso de animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata. Se realizaron los máximos esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

Caracterizar la dinámica de anticuerpos e inocuidad luego de inocular la cepa autóctona aislada en animales crónicamente infectados

Cultivo de la cepa autóctona

Para la elaboración del inóculo, los taquizoítos de la nueva cepa NC-Argentina LP1,

se multiplicaron en células VERO mantenidas en atmósfera con 5% de CO₂. A partir de la inoculación con taquizoítos, la monocapa de células se mantuvo en medio suplementado conteniendo 2% de SFB. Se realizó el transporte al establecimiento luego de 48 horas de inoculada la monocapa de células. Los taquizoítos fueron cosechados durante su fase intracelular cuando un 80% de células de la monocapa estuvieron infectadas. Las células fueron desprendidas mediante un raspador estéril y la suspensión de células conteniendo los protozoos fue recolectada en tubos para centrífuga efectuándose un lavado. El material recolectado fue pasado estérilmente a través de agujas de 25 de diámetro para liberar los taquizoítos intracelulares. Este material fue centrifugado a 1350xg durante 15 minutos eliminándose el sobrenadante y resuspendiéndose nuevamente. Luego se realizó el recuento en cámara de Neubauer de 2 alícuotas del material y finalmente se ajustó a una concentración final de 1x10⁷ protozoos/ml en un volumen final de 2 ml de inmunógeno. El inóculo fue transportado a en conservadora a 8°C hasta el momento de la inoculación la cual se realizó a los 45 minutos posteriores a la cosecha de los protozoos (Hecker et al., 2013). Las vaquillonas fueron asignadas a 2 grupos: vacunadas y control. La inoculación se realizó por vía subcutánea.

Las diluciones séricas fueron expresadas como media geométrica \pm desvío estándar geométrico (MG \pm DEG). Para el análisis estadístico las diluciones fueron transformadas logarítmicamente y analizadas utilizando un modelo lineal general para medidas repetidas (Proc. GLIMMIX; SAS Institute Inc.). Se incluyó al tratamiento (vacuna o placebo), día de muestreo y su interacción como efectos fijos. Cuando fue necesario, las comparaciones múltiples *post-hoc* fueron realizadas empleando el ajuste de Holm-Tukey. La normalidad y homoscedasticidad de los residuales fueron evaluados empleando el test de Shapiro Wilk y de Levene, respectivamente, modelándose la heterogeneidad de varianza cuando fue necesario. Se empleó un nivel de significancia de $\alpha=0,05$.

Resultados

Determinar la seroprevalencia de la enfermedad y su asociación con la ocurrencia de abortos.

La seroprevalencia total de neosporosis bovina fue 18,9% en 2564 animales analizados en el año 2011. La proporción de vaquillonas seropositivas fue significativamente mayor que en vacas (Tabla 1).

Tabla 1: Proporción de vacas y vaquillonas de primer servicio seropositivas a *N. caninum*

Categoría	% seropositivas (total)
Vaca	16,1 (2415) ^a
Vaquillona	27,9 (746) ^b
Total	18,9 (3161)

a, b Letras diferentes indican diferencias con $P < 0,05$. Asimismo, hubo asociación estadística significativa entre seropositividad y el evento aborto en ambas categorías; siendo esta asociación aún mayor para la categoría vaquillona (Tabla 2). Una vaca seropositiva tuvo aproximadamente el doble de posibilidades de abortar que una vaca seronegativa (OR=1,9; IC95%: 1,2-2,3). Asimismo una vaquillona positiva tuvo cerca de 5 veces más posibilidades de sufrir un aborto que su contraparte seronegativa (OR=5,1; IC95%: 2,7-9,5). Interesantemente, se observaron diferencias significativas en el riesgo de abortar cuando se considera la categoría aún siendo ambas seropositivas; es decir, una vaquillona seropositiva tuvo más del doble de posibilidades de abortar que una vaca seropositiva (OR=2,4; IC95%: 1,3-4,3).

Tabla 2: Proporción de la ocurrencia de abortos según la categoría y su estado serológico

Categoría	% de abortos (Total)	
	Seropositiva	Seronegativa
Vaca	14,1 (389) ^{Aa}	8,1 (2026) ^{Ab}
Vaquillona	28,4 (208) ^{Ba}	7,2 (538) ^{Ab}
Total	19,1 (597)	7,9 (2564)

Letras diferentes en la misma columna (AB) y fila (ab) indican diferencias con $P < 0,05$ Caracterizar las vías de transmisión para establecer las medidas de control

Considerando el muestreo de las madres y el sangrado pre-calostroal se identificaron 9 animales con riesgo de transmisión vertical y 45 en riesgo de

transmisión horizontal, respectivamente. No se observó efecto de la categoría de la madre ni del sexo de la cría sobre las variables estudiadas ($P>0,05$). La eficiencia y probabilidad de transmisión, fue significativamente mayor para la vía de transmisión vertical ($P<0,05$; Tabla 3). Igualmente la proporción de terneros infectados por cada una de las vías estudiadas no difirió significativamente ($P>0,05$) debiendo considerarse que si bien la vía de transmisión horizontal fue menos eficiente, la proporción de animales en riesgo fue significativamente mayor ($P<0,05$).

Tabla 3: Caracterización de las vías de transmisión para la neosporosis bovina considerando la población en riesgo, la eficiencia de transmisión y proporción de animales infectados.

Vía de transmisión	Vertical	Horizontal
Población en riesgo	16,6% (9/54) ^a	83,3% (45/54) ^b
Eficiencia	77,8% (7/9) ^a	13,3% (6/45) ^b
Probabilidad (IC95%)	77,8% (42,1 – 94,4) ^a	13,3% (6,1 – 26,7) ^b
Proporción de animales infectados	53,9% (7/13) ^a	46,2% (6/13) ^a

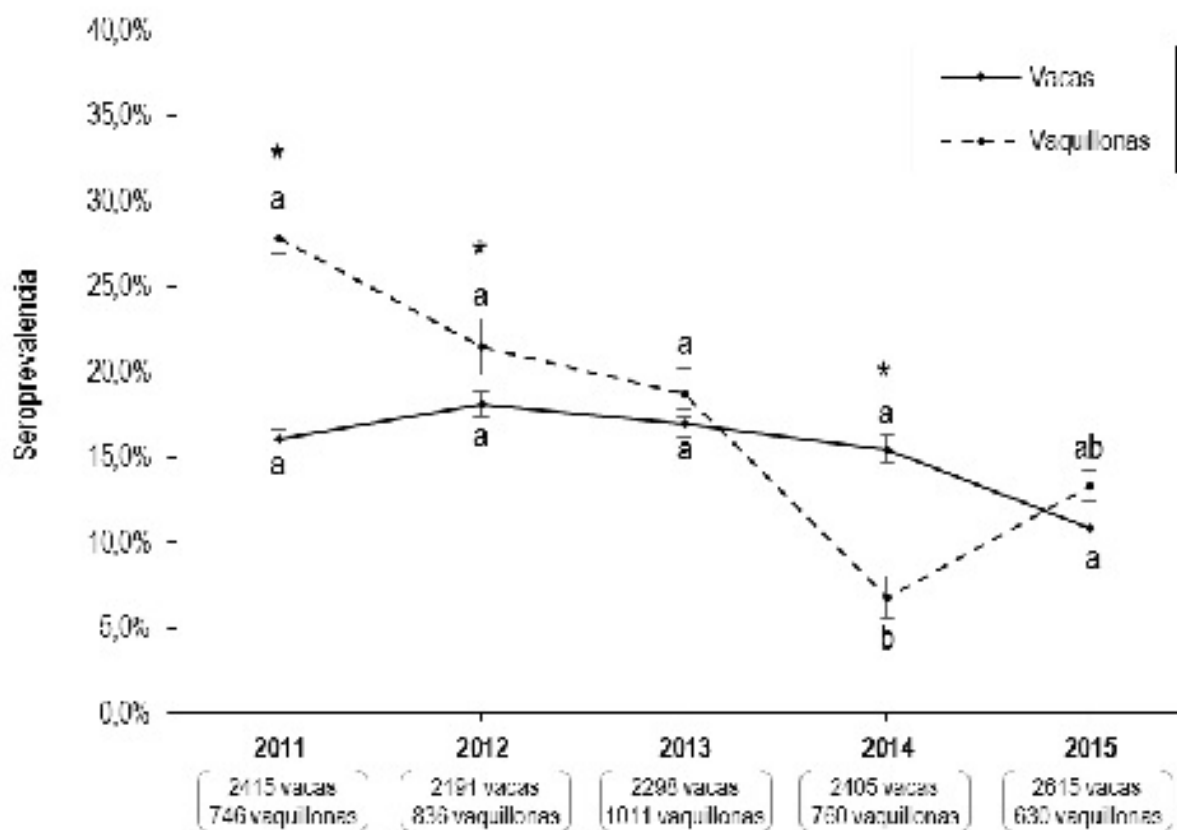
a,b Letras diferentes en la misma fila indican diferencias con $P<0,05$ Disminuir la seroprevalencia y los abortos mediante identificación y eliminación gradual de vacas seropositivas;

Se observó una interacción significativa entre el año y la categoría ($P<0,05$). Aunque se observaron diferencias significativas en la seroprevalencia y el porcentaje de aborto general a lo largo de los años para la categoría vaquillona ($P<0,05$; Figuras 1 y 2); dichas diferencias no se observaron en la categoría vaca ($P>0,05$; Figuras 1 y 2).

Debe considerarse que este cambio en el porcentaje de abortos no se asoció a una disminución en el número de abortos en animales seronegativos (Figura 3), los cuales no variaron a lo largo de los años ($P>0,05$), lo cual permitiría inferir que dicha disminución se debió a la menor proporción de animales seropositivos y del número de abortos (Figura 4). Por otro lado debe considerarse que el riesgo de abortos en animales seropositivos fluctuó significativamente a lo largo de los años

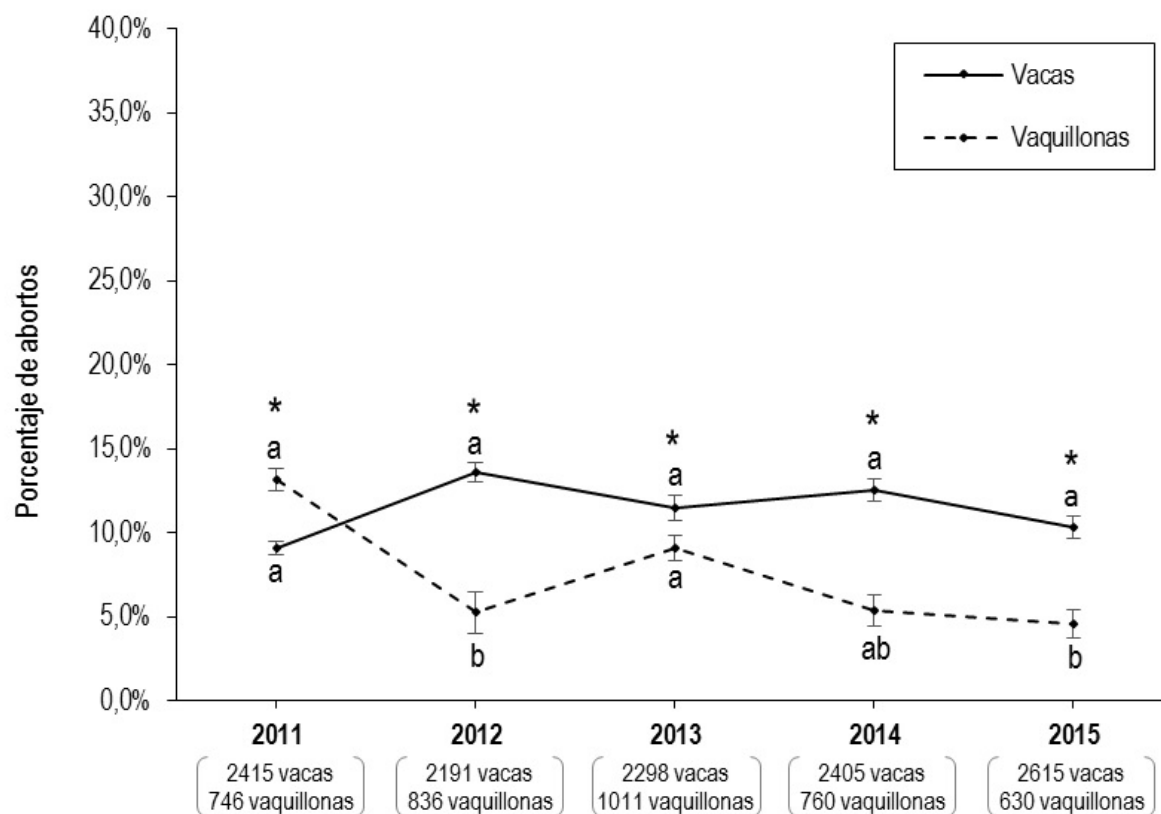
($P < 0,05$).

Figura 1: Evolución de la seroprevalencia a *N. caninum* durante 5 años en vacas y vaquillonas.

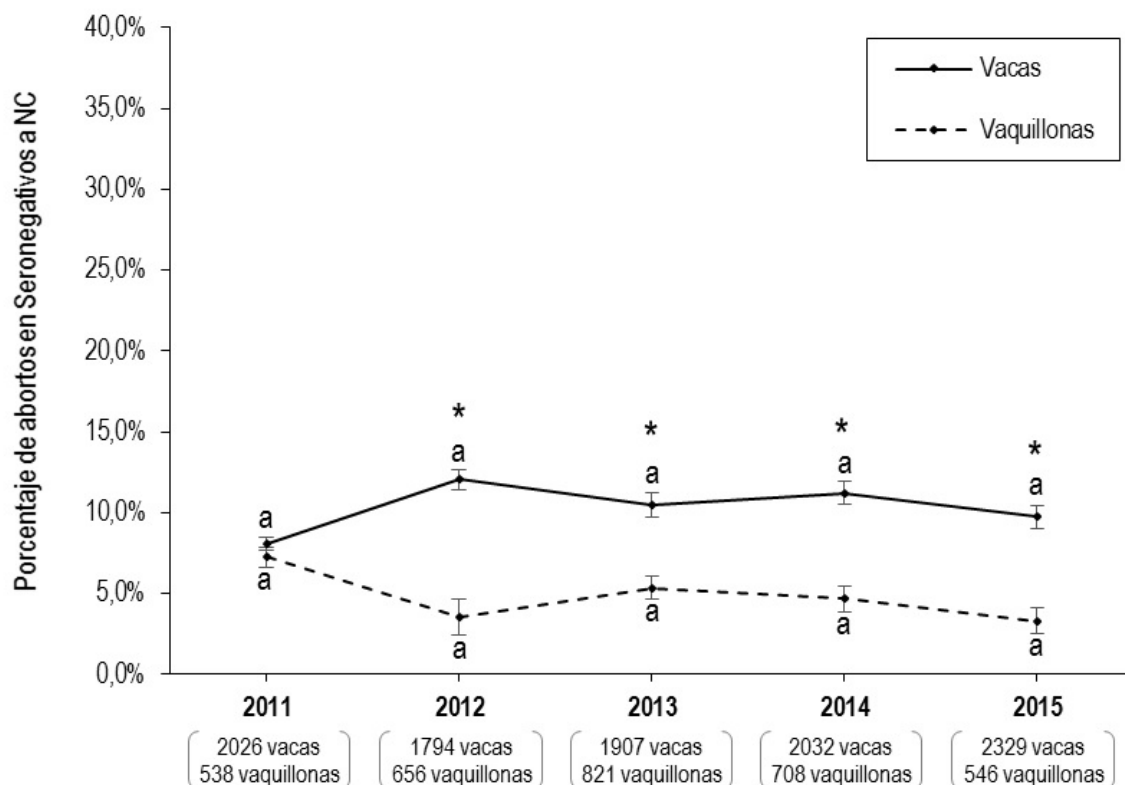


a,b Letras diferentes indican diferencias con $P < 0,05$ entre años para una misma categoría (Holm-Tukey)

* Diferencias con $P < 0,05$ entre categorías **Figura 2:** Porcentaje de abortos general durante 5 años en vacas y vaquillonas.

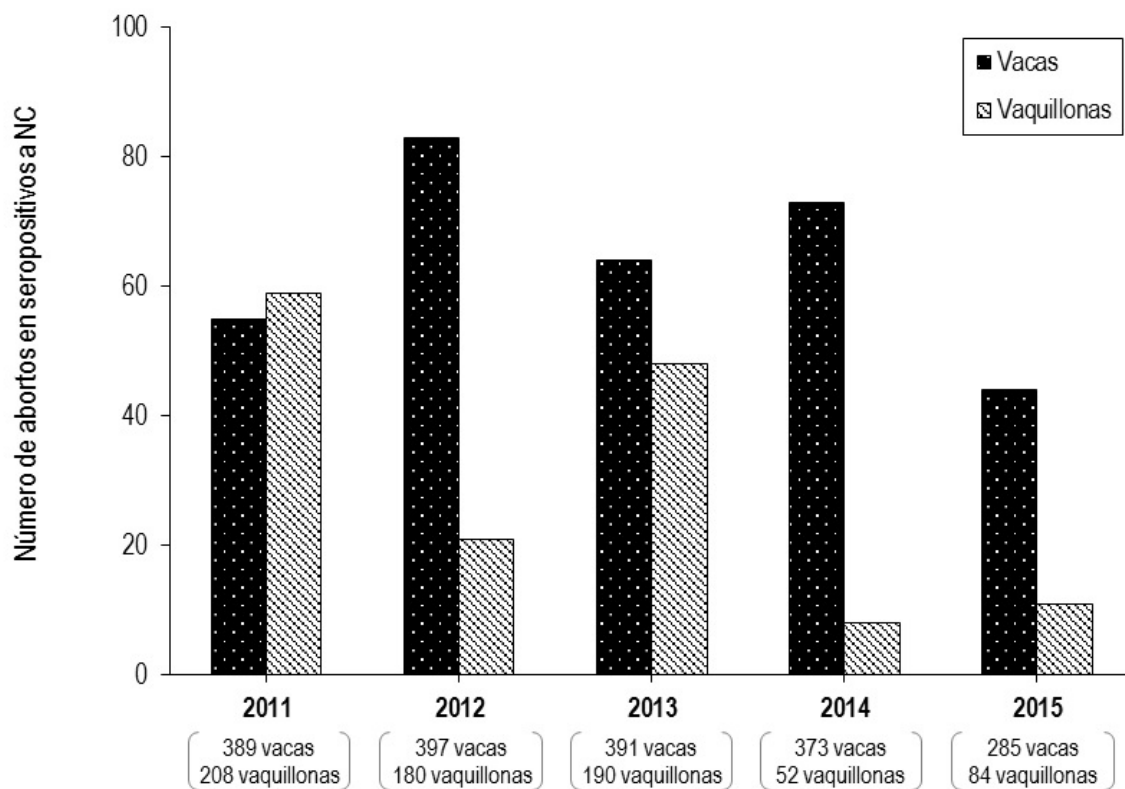


a,b Letras diferentes indican diferencias con $P < 0,05$ entre años para una misma categoría (Holm-Tukey) * Diferencias con $P < 0,05$ entre categorías **Figura 3:** Porcentaje de abortos en animales seronegativos a *N. caninum* durante 5 años.



a,b Letras diferentes indican diferencias con $P < 0,05$ entre años para una misma categoría (Holm-Tukey)

* Diferencias con $P < 0,05$ entre categorías **Figura 4: Número de abortos en animales**



durante 5 años. Observar el bajo número de vaquillonas seropositivas y el bajo número de abortos en los años 2014 y 2015.

Incrementar la productividad de carne mediante utilización de semen de bovinos para carne en hembras productoras de leche seropositivas a *N. caninum*.

Los resultados de este objetivo son ejemplificados sólo para el ejercicio de un período de reproducción (Primavera 2015) (Tabla 3).

Tabla 4: Aumento en los kilogramos y pesos por kilogramos debido a la implementación de la IA con semen de raza Hereford en hembras lecheras.

Sexo y Raza	Cab	kg PV** Promedio/ Cab	Total kg	\$/kg	Diferencia en % de Cruza HF vs Lechero	
					kg PV Vendido	\$/kg PV Vendido
Nov lechero	336	338,3	113.681	19,7	-	-
Nov cruza HF*	65	354,5	23.042	23,9	4,60%	18%
Vaq cruza HF	38	340,8	12.950	22,4	0,70%	12%

*HF: Herford

**PV: peso vivo *Objetivo 5: Aislar cepas de N. caninum*

De los 20 ratones inoculados, sólo 1 ratón resultó seropositivo. Dicho animal identificado como R1 y había sido inoculado con SNC del ternero E. El título a IFI de R1 fue de 1:400. A la fecha del sangrado (26 días post inoculación -d.p.i.-) presentaba signos de debilidad, apatía, encorvamiento y pelo hirsuto, muriendo al día siguiente. Se procesó el SNC del ratón R1 y se inoculó en 2 ratones: R2 y R3. A los 36 d.p.i., los ratones R2 y R3 fueron eutanasiados con títulos serológicos a IFI de 1:1600 y 1:6400, respectivamente. Se realizó un pool con los SNC de R2 y R3 y se inoculó en un cuarto ratón: R4. A los 41 d.p.i., R4 fue eutanasiado y el título serológico a IFI fue de 1: 200. El líquido de la cavidad peritoneal de R4 con 0,5 x10⁶ taquizoítos totales fue utilizado para infectar una botella de cultivo con células VERO. A los 4 d.p.i. se observó la presencia de focos de taquizoítos bajo observación con microscopio óptico.

Cuando se realizó la histopatología de los ratones R1, R2, R3 y R4 se evidenciaron lesiones severas compatibles con *N. caninum*. Se amplificó ADN de *N. caninum* de la totalidad de las muestras analizadas de estos ratones (SNC, pulmones, corazón, hígado, bazo, riñones, músculo, lavado peritoneal) y de los taquizoítos de cultivo

celular.

Se logró la amplificación de los 10 microsatélites y el análisis por electroforesis capilar y/o secuenciación para las muestras positivas a PCR a *N. caninum*. El patrón genético resultante fue único y distinto a los aislamientos ya reportados de *N. caninum* (Tabla 4). El nuevo aislamiento se designó NC-Argentina LP1 (*N. caninum*-Argentina La Plata1) sobre la base del país y laboratorio donde se realizó el aislamiento.

Tabla 4. Alelos de los microsatélites del nuevo aislamiento de *N. caninum* analizados mediante electroforesis capilar o secuenciación

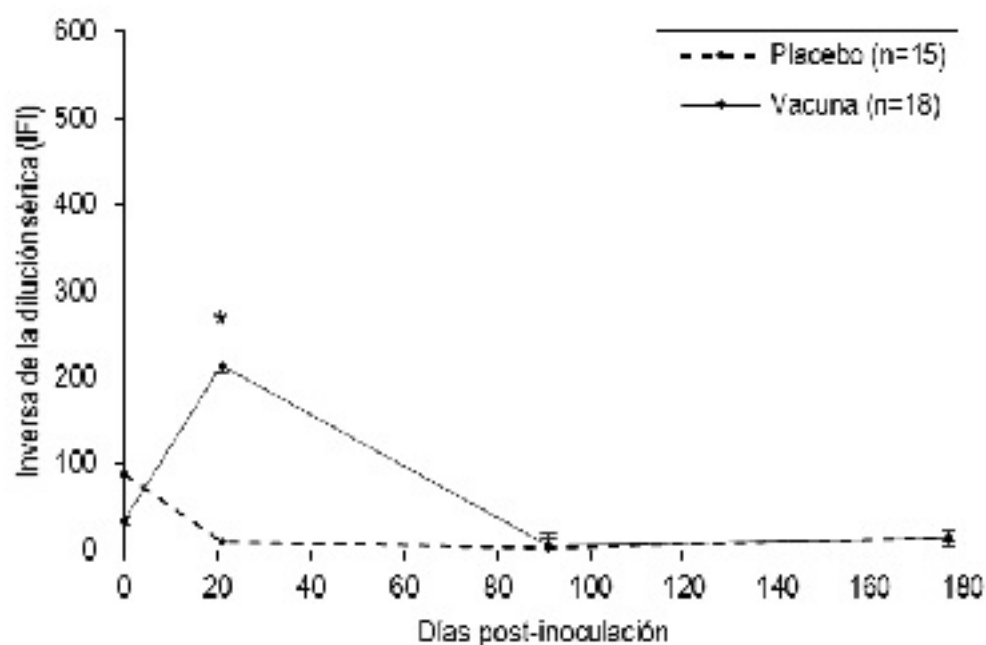
Tamaño del microsatélite (pb) (MS1B,3,5,6A,6B,7,12 y 21)^a o secuencia (MS2 y10)		
	Motivo de secuencia repetida^a (5 –3)	
<i>N. caninum</i> MS		Tamaño de MS (pb)^a
MS 1B	(AT)AC(AT)	26
MS2	(AT) <i>n</i> -TTGTATC-(AT) <i>n</i> -GT(AT) <i>n</i>	6/10/2002
MS3	(AT)	24
MS5	(TA)TGTA	32
MS6A	(TA)	32
MS6B	(AT)	26
MS7	(TA)	20
MS10	(ACT) <i>n</i> -(AGA) <i>n</i> -(TGA) <i>n</i>	6-15-9
MS12	(GT)	32
MS21	(TACA)	40

MS: microsatélite; pb: pares de base; n: número de motivos de secuencias repetidas

a El tamaño de los marcadores de microsatélites fue calculado en base a la secuencia producida por el Neospora caninum Sequencing Group at the Sanger Institute for Nc-Liv *N. caninum* strain, disponible en <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/pathogens/Neospora/caninum/NEOS.contigs.version1>, y secuencias reportadas. Caracterizar la dinámica de anticuerpos e inocuidad luego de inocular la cepa autóctona aislada en animales crónica infectados.

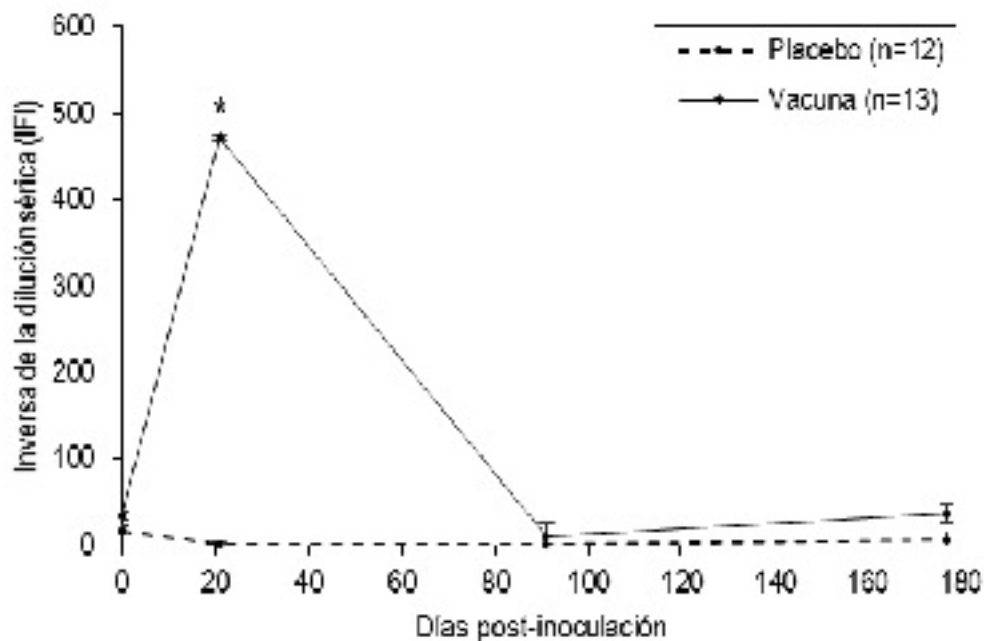
Se observó una interacción significativa entre tiempo y tratamiento en ambas categorías (vaca y vaquillona) (Figuras 5 y 6). Antes de la inoculación no se detectaron diferencias en el título de anticuerpos en los grupos tratados y placebo ($P>0,05$). Sin embargo, luego de inocular los parásitos vivos se observó un aumento significativo en el título de anticuerpos al 21 d.p.i. ($P<0,05$). Este aumento significativo fue temporario, regresando a niveles similares entre grupo tratado y placebo ($P>0,05$). No se registraron reacciones locales adversas en el sitio de inoculación entre animales tratados y controles.

Los animales actualmente se encuentran en su 6^o mes de gestación habiéndose registrado sólo un aborto en el grupo placebo. Los resultados finales de esta experiencia se mostrarán oportunamente.



* Diferencias con $P<0,05$ entre tratamientos

Figura 5: Cinética de anticuerpos en vacas seropositivas a *N. caninum* luego de la inoculación de una cepa autóctona del establecimiento (media geométrica \pm DEG).



* Diferencias con $P < 0,05$ entre tratamientos **Figura 6:** Cinética de anticuerpos en vaquillonas seropositivas a *N. caninum* luego de la inoculación de una cepa autóctona del establecimiento (media geométrica \pm DEG).

Conclusiones

-Resulta de importancia hacer un diagnóstico adecuado de la situación sanitaria en el establecimiento respecto a la neosporosis bovina, comenzando por determinar la seroprevalencia en diferentes categorías animales vacas y vaquillonas, y más importante determinar su asociación con la ocurrencia de abortos;

-Para poder determinar el éxito de las medidas de control de la neosporosis, es imperante establecer cuáles son las vías de transmisión predominantes para cada establecimiento;

-Aunque en este establecimiento se demostró una alta eficacia en la transmisión vertical de la neosporosis es importante considerar que durante el estudio longitudinal se demostró una proporción de animales expuestos (transmisión horizontal) similar a los que se habían infectado congénitamente (transmisión vertical);

-Se logró disminuir significativamente la seroprevalencia de neosporosis y los abortos en vaquillonas mediante identificación y eliminación gradual de animales seropositivos; Se logró disminuir significativamente la seroprevalencia de neosporosis y los abortos en vaquillonas mediante identificación y eliminación gradual de animales seropositivos y evitando dejar como reposición hijas de

madres positivas.

-La implementación de la IA con semen de raza para carne es una herramienta interesante para aquellos establecimientos lecheros que tengan la posibilidad de criarlos y engordarlos. Esto permite que una vaca lechera infectada siga en producción (siempre que no sufra un aborto) dejando una descendencia que no ingresará al tambo (posiblemente infectado congénitamente) y tendrá mejor desempeño en la producción de kilogramos de carne con un precio más competitivo.

-Se logró establecer un protocolo exitoso para aislar una nueva cepa de *N. caninum* desde un ternero asintomático, la cual podrá ser caracterizada y eventualmente utilizada en nuevas pruebas diagnósticas o vacunas experimentales.

-La nueva cepa (NC-Argentina LP1) fue utilizada como autovacuna en el mismo establecimiento donde fue aislada. Si bien sólo se ha podido caracterizar la dinámica de anticuerpos e inocuidad, se prevé evaluar su efecto de protección para la transmisión vertical y el aborto en los próximos meses ya que los animales transcurren su sexto mes de gestación.

Consideraciones finales

Como se mencionó en la introducción de este trabajo, hay varios aspectos de la neosporosis bovina que permanecen desconocidos y no existen herramientas tradicionales eficaces para el control de las graves pérdidas económicas que provoca esta enfermedad, sobre todo en los sistemas de producción lechera.

Las herramientas de control integrales presentadas en este trabajo, ponen en manifiesto la importancia que tiene un acercamiento más holístico para poder prevenir estas pérdidas en sistemas de producción intensivos donde hay tantos aspectos externos que pueden llegar a influenciar negativamente la sanidad y economía del productor tambero de Argentina.

Bibliografía

Almeria S, López-Gatius F. Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects. Res Vet Science. 2013; 95: 303-309.

Bacigalupe D, Basso W, Caspe SG, Moré G, Lischinsky L, Gos ML, Leunda M, Campero L, Moore DP, Schares G, Campero CM, Venturini MC. *Neospora caninum* NC-6 Argentina induces fetopathy in both serologically positive and negative

experimentally inoculated pregnant dams. *Parasitol Res.* 2013; 112: 2585-2592.

Basso W, Moré G, Quiroga MA, Balducchi D, Schares G, Venturini MC. *Neospora caninum* is a cause of perinatal mortality in axis deer (*Axis axis*). *Vet Parasitol.* 2014; 199: 255-258.

Basso W, Schares S, Bärwald A, Herrmann DC, Conraths FJ, Pantchev N, Vrhovec MG, Schares G. Molecular comparison of *Neospora caninum* oocyst isolates from naturally infected dogs with cell culture-derived tachyzoites of the same isolates using nested polymerase chain reaction to amplify microsatellite markers. *Vet Parasitol.* 2009; 160:43-50.

Basso W, Schares S, Minke L, Bärwald A, Maksimov A, Peters M, Schulze C, Müller M, Conraths FJ, Schares G. Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Vet Parasitol.* 2010; 173: 24-31.

Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, Dubey JP. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol.* 2001; 87: 612-618.

Campero CM. Opciones para el control de la neosporosis bovina. *Rev Taurus.* 2014; 16: 4-15.

Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G, Odriozola H, Bretschneider G, Poso MA. *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet Rec.* 1998; 143: 228-229.

Campero CM, Moore DP, Odeón AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun.* 2003; 27: 359-369.

Campero LM, Venturini MC, Moore DP, Massola L, Lagomarsino H, García B, Bacigalupe D, Rambeaud M, Pardini L, Leunda MR, Schares G, Campero CM. Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. *Exp Parasitol.* 2015; 155: 8-12.

Dellarupe A, Regidor-Cerrillo J, Jiménez-Ruiz E, Schares G, Unzaga JM, Venturini MC, Ortega-Mora LM. Clinical outcome and vertical transmission variability among canine *Neospora caninum* isolates in a pregnant mouse model of infection. *Parasitology.* 2014a; 141: 356-366.

Dellarupe A, Regidor-Cerrillo J, Jiménez-Ruiz E, Schares G, Unzaga JM, Venturini MC, Ortega-Mora LM. Comparison of host cell invasion and proliferation among *Neospora caninum* isolates obtained from oocysts and from clinical cases of naturally infected dogs. Exp Parasitol. 2014b; 145: 22-28.

Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine neosporosis. Vet Parasitol. 2006; 140: 1-34.

Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals-The last five years. Vet Parasitol. 2011; 180: 90-108.

Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 2007; 20: 323-367.

Echaide I, Valentini B, Torioni de Echaide S. Neosporosis bovina: análisis seroepidemiológico de un hato lechero mediante IFI y ELISA. Memorias de la XIV Reunión Científica Técnica Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio de Diagnóstico, 2002, Secc. Par-01, Villa General Belgrano, Córdoba, Argentina.

Fort M, Edelsten M, Maley S, Innes E. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina. Acta Parasitol. 2015; 60: 275-282.

Hecker YP, Moore DP, Quattrocchi V, Regidor-Cerrillo J, Verna A, Leunda MR, Morrell E, Ortega-Mora LM, Zamorano P, Venturini MC, Campero CM. Immune response and protection provided by live tachyzoites and native antigens from the NC-6 Argentina strain of *Neospora caninum* in pregnant heifers. Vet Parasitol. 2013; 197: 436-446.

Kul O, Atmaca HT, Anteplioglu T, Ocal N, Canpolat S. *Neospora caninum*: the First Demonstration of the Enteroepithelial Stages in the Intestines of a Naturally Infected Dog. J Comp Pathol. 2015; 153:9-13.

Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am J Vet Res. 1989; 50: 1981-1983.

McAllister MM, Björkman C, Anderson-Sprecher R, Rogers DG. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. J Am Vet Med Assoc. 2000; 217: 881-887.

Miller C, Quinn H, Ryce C, Reichel MP, Ellis JT. Reduction in transplacental

transmission of *Neospora caninum* in outbred mice by vaccination. *Int J Parasitol.* 2005; 35:821-828.

Monney T, Hemphill A. Vaccines against neosporosis: what can we learn from the past studies? *Exp Parasitol.* 2014; 140: 52-70.

Moore DP, Leunda MR, Zamorano PI, Odeón AC, Romera SA, Cano A, de Yaniz G, Venturini MC, Campero CM. Immune response to *Neospora caninum* in naturally infected heifers and heifers vaccinated with inactivated antigen during the second trimester of gestation. *Vet Parasitol.* 2005; 130: 29-39.

Moore DP, Regidor-Cerrillo J, Morrell E, Poso MA, Cano DB, Leunda MR, Linschinky L, Odeón AC, Odriozola E, Ortega-Mora LM, Campero CM. The role of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in spontaneous bovine abortion in Argentina. *Vet Parasitol.* 2008;156:163-167.

Moore D, Reichel M, Spath E, Campero C. *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. *Trop Anim Health Prod.* 2013; 45: 1237-1241.

Moré G, Bacigalupe D, Basso W, Rambeaud M, Beltrame F, Ramirez B, Ventruini MC, Venturini L. Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet Parasitol.* 2009; 160: 51-54.

Regidor-Cerrillo J, Pedraza-Díaz S, Gómez-Bautista M, Ortega-Mora LM. Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *J Parasitol.* 2006; 92:517-524.

Reichel MP, Alejandra Ayanegui-Alcérreca M, Gondim LF, Ellis JT. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle- the billion dollar question. *Int J Parasitol.* 2013; 43: 133-142.

Reichel MP, Ellis JT. If control of *Neospora caninum* infection is technically feasible does it make economic sense? *Vet Parasitol.* 2006; 142: 23-34.

Reichel MP, Moore DP, Hemphill A, Ortega-Mora LM, Dubey JP, Ellis JT. A live vaccine against *Neospora caninum* abortions in cattle. *Vaccine.* 2015; 33: 1299-1301.

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Regidor-Cerrillo J, Alvarez-García G, Marugan-Hernández V, Pedraza-Díaz S, Blanco-Murcia J, Prenafeta A, Ortega-Mora

LM. Isolation and characterization of a bovine isolate of *Neospora caninum* with low virulence. *Vet Parasitol.* 2009; 159:7-16.

Rojo-Montejo S, Collantes-Fernández E, Pérez-Zaballos F, Rodríguez-Marcos S, Blanco-Murcia J, Rodríguez-Bertos A, Prenafeta A, Ortega-Mora LM. Effect of vaccination of cattle with the low virulence Nc-Spain 1H isolate of *Neospora caninum* against a heterologous challenge in early and mid-gestation. *Vet Res.* 2013; 44: 106.

Venturini L, Di Lorenzo C., Venturini M.C., Romero J. Anticuerpos anti *Neospora* sp., en vacas que abortaron. *Vet Arg.* 1995; 12: 167-170.

Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, Echaide I, Basso W, y col. *Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *Int J Parasitol.* 1999; 29: 1705-1708.

Weber FH, Jackson JA, Sobecki B, Choromanski L, Olsen M, Meinert T, Frank R, Reichel MP, Ellis JT. On the efficacy and safety of vaccination with live tachyzoites of *Neospora caninum* for prevention of neospora-associated fetal loss in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20: 99-105.

Weston JF, Heuer C, Williamson NB. Efficacy of a *Neospora caninum* killed tachyzoite vaccine in preventing abortion and vertical transmission in dairy cattle. *Prev Vet Med.* 2012; 103: 136-144.

Williams DJ, Guy CS, Smith RF, Ellis J, Bjorkman C, Reichel MP, Trees AJ. Immunization of cattle with live tachyzoites of *Neospora caninum* confers protection against fetal death. *Infect Immun.* 2007; 75: 1343- 1348.
