

CAPÍTULO 15

Neospora caninum

Lucía María Campero, Andrea Dellarupe, Magdalena Rambeaud y M. Cecilia Venturini

Clasificación

Phylum: Apicomplexa

Clase: Sporozoasida

Orden: Eucoccidiorida

Familia: Sarcocystidae

Neospora caninum es un protozoo parásito que causa la neosporosis, una enfermedad global, cuyo efecto negativo sobre la eficiencia reproductiva se manifiesta por las grandes pérdidas económicas que causa en la ganadería bovina. En el bovino provoca abortos y frecuentemente produce el nacimiento de animales congénitamente infectados. En el perro genera diversos cuadros neuromusculares.

Morfología

Neospora caninum presenta tres estados infectantes: **taquizoítos**, **quistes tisulares** y **ooquistes**. Los taquizoítos y quistes tisulares son estadios intracelulares de los hospedadores infectados. Los **taquizoítos** de *N. caninum* tienen forma de semiluna, de aproximadamente 6 µm x 2 µm y carecen de gránulos de amilopectina. Pueden estar en distintos tipos celulares y cada célula hospedadora puede contener varios taquizoítos, alojados dentro de la vacuola parasitófora en el citoplasma. Cada taquizoíto tiene roptrias con contenido electrodensó, algunas de las que se extienden posteriormente al núcleo.

Los **quistes tisulares** son redondos u ovoides, su tamaño varía considerablemente, dependiendo del número de **bradizoítos** que alojen en su interior. En los perros se han registrado quistes tisulares de hasta 107 µm de diámetro con una pared de 4 µm de espesor. En bovinos, los quistes tisulares se encuentran principalmente en cerebro y médula espinal donde raramente exceden las 50 µm de diámetro con una pared < a 2,5 µm de espesor. Los bradizoítos también

tienen forma de semiluna de 8 μm x 2 μm , poseen un núcleo terminal y contienen algunos gránulos de amilopectina. Suelen encontrarse quistes tisulares en tejido extraneural como en músculo esquelético.

Los **ooquistes** tienen forma esférica o subesférica de 10-12 μm , de pared lisa de 0,6-0,8 μm de espesor, sin micrópilo. Se eliminan en estado no esporulado en la materia fecal del hospedador definitivo. Esporulan en el ambiente, observándose en su interior 2 **esporocistos** elipsoidales (8 μm x 6 μm) con 4 **esporozoítos** cada uno (7 μm x 2 μm) de forma alargada.

Ciclo biológico

Neospora caninum es un organismo de vida endocelular obligado, no zoonótico, con un ciclo de vida heteroxeno, donde intervienen dos tipos de hospedadores, los hospedadores definitivos (HD) en los que se completa la fase sexual, y los intermediarios (HI) en los que se lleva a cabo la fase asexual. Existen 3 formas infectantes: taquizoítos, bradizoítos (quistes) y esporozoítos (ooquistes).

Los taquizoítos y bradizoítos se localizan en diferentes tejidos de los HI y HD, ambos son estadios intracelulares asexuales del parásito, que conservan la morfología y características ultraestructurales típicas de las fases infectivas de los protozoos apicomplexa. Los esporozoítos se encuentran dentro de los ooquistes que son excretados en la materia fecal de los HD.

Los HD descritos hasta el presente son los cánidos como el perro (McAllister et al., 1998; Basso et al., 2001), coyote (*Canis latrans*) (Gondim et al., 2004), dingo (*Canis lupus dingo*) (King et al., 2010) y el lobo gris (*Canis lupus*) (Dubey et al., 2011). En ellos se cumplen tanto la fase extraintestinal (esquizogonia) como la intestinal (gametogonia) del ciclo que se cree precede a la formación de los ooquistes, desempeñando el rol tanto de HD como de HI. Los ooquistes son eliminados al ambiente no esporulados, y luego de 1 a 3 días esporulan, transformándose así en infectantes y volviéndose resistentes en el ambiente, por lo que son claves en la epidemiología de la neosporosis.

Varios rumiantes actúan como HI, entre ellos, el ganado bovino, caprino, ovino, ciervos y búfalos. Sin embargo, el bovino se considera el HI más importante ya que en él se producen los signos más relevantes que generan importantes pérdidas económicas a nivel mundial. Por otro lado, *N. caninum* ha sido también detectado serológicamente y/o por presencia de ADN mediante la técnica de PCR, en una amplia variedad de especies tanto domésticas (equinos, felinos, suinos, camélidos y aves, entre otros), como silvestres (mapaches, zorro rojo, lobo, linco, corzo, venado de cola blanca, gorrión; rinoceronte, roedores; carpincho, topo campesino, conejo, liebre europea, entre otros).

Cuando el HI ingiere los ooquistes esporulados presentes en pasturas y/o aguas contaminadas, éstos pierden la pared ooquística en el tracto gastrointestinal y liberan los esporozoítos, que atraviesan la pared intestinal produciéndose una multiplicación asexual extraintestinal, con for-

mación de taquizoítos (esquizozoítos de división rápida) en diversos órganos y tejidos, destruyendo las células infectadas y ocasionando parasitemia durante la fase aguda de la infección. En etapas posteriores, los taquizoítos penetran en las células de tejidos neuromusculares, continúan la esquizogonia sin destruir a la célula hospedadora, dando lugar a los bradizoítos (esquizozoítos de división lenta) contenidos en quistes tisulares. Si el HD ingiere tejidos con dichos quistes u ooquistes del medio, se infectará, completando así el ciclo (Fig. 1).

Existen dos vías de transmisión, la vía horizontal y la vertical. La *transmisión horizontal* ocurre cuando un animal se infecta ya sea por la ingesta de taquizoítos y/o quistes tisulares o bien por consumir agua y/o alimentos contaminados con ooquistes esporulados. La *transmisión vertical* (transplacentaria) ocurre durante la preñez, cuando el feto adquiere la infección a través de su madre y suele ser la vía de transmisión más común y efectiva en el bovino (Fig. 1) (Dubey & Schares, 2011). A su vez, según el origen de esta infección transplacentaria, se dice que la transmisión es “*exógena*”, cuando la madre adquiere una primoinfección al ingerir pasturas o agua contaminadas con ooquistes esporulados del ambiente, mientras que la transmisión es “*endógena*” cuando el feto se infecta como consecuencia de la reactivación de una infección crónica latente de la madre (recrudescencia) (Trees & Williams, 2005) (Fig. 2). Si bien en ambos casos el feto infectado puede ser abortado, generalmente entre el 3er y 8vo mes de gestación, en la mayoría de los casos de transmisión transplacentaria endógena nacen terneros sanos, pero congénitamente infectados (Pare et al., 1996).

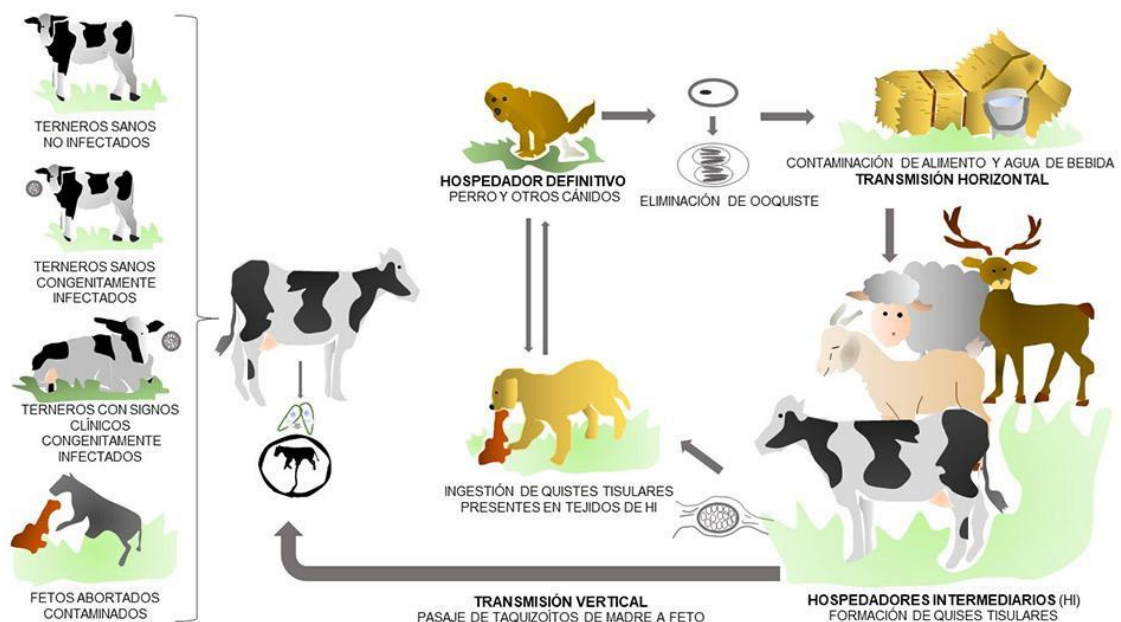


Figura 1. Ciclo de vida de *Neospora caninum*.

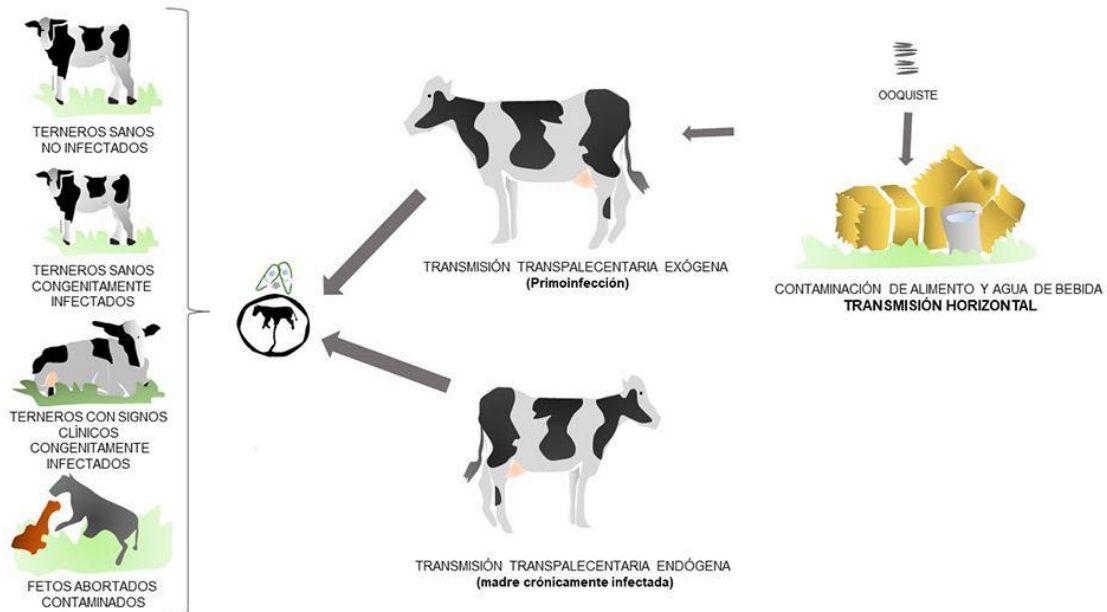


Figura 2. Ciclo de vida de *Neospora caninum*.

Patogenicidad y sintomatología

Los signos clínicos ante la infección por *N. caninum*, estarán determinados por la edad del animal, sexo, estado inmune, número y forma infectante, la predisposición genética individual, la parte del sistema nervioso central (SNC) afectada, y en el caso de las hembras preñadas, por el momento de la gestación en que se produzca la infección.

El principal signo clínico en los bovinos es el aborto, aunque también puede observarse excepcionalmente nacimiento de terneros débiles, con signología nerviosa. Sin embargo, en la mayoría de los casos, en hembras bovinas preñadas infectadas con *N. caninum*, la gestación resulta en el nacimiento de un ternero sano, pero congénitamente infectado. La transmisión vertical puede ocurrir en gestaciones sucesivas, y cuando las terneras congénitamente infectadas se conservan para reposición en el rodeo, pueden también transmitir la infección a su descendencia, lo cual resulta en la persistencia endémica de la infección en el establecimiento. La mayoría de los abortos bovinos causados por *N. caninum* ocurren entre los 4 y 7 meses de gestación. Sin embargo, el riesgo de transmisión del parásito al feto aumenta a medida que progresa la edad gestacional. En consecuencia, una infección en los estadios tempranos de la preñez probablemente resulte en pérdidas embrionarias o abortos, mientras que una infección en etapas tardías de la gestación resultará en una eficiente transmisión transplacentaria y nacimiento de terneros sanos congénitamente infectados.

En los caninos, la neosporosis se considera una enfermedad primaria del SNC y sistema músculo-esquelético, pudiendo comprometer a diversos órganos. Los taquizoítos son responsables de la mayor parte de la acción citopática y daño tisular. En los casos clínicos se observan

principalmente manifestaciones neuromusculares debido a la meningoencefalitis, miositis o polirradiculoneuritis. Los cachorros generalmente desarrollan paresia progresiva, hiperextensión rígida de los miembros posteriores y atrofia muscular. La vía de transmisión transplacentaria es también muy eficiente en caninos, y la mayoría de los signos ocurren como una exacerbación de una infección adquirida congénitamente. Las perras con infección subclínica pueden transmitir el parásito en forma vertical a varias camadas sucesivas, aunque no todos los cachorros de una misma camada están siempre infectados (Cole et al., 1995). A su vez algunos cachorros desarrollan signos clínicos entre las dos semanas y los seis meses de edad, mientras que en otros la infección se puede mantener en forma subclínica durante toda la vida del animal u ocurrir una reactivación posterior.

Respuesta inmune

Neospora caninum es un protozoo de vida intracelular. Por eso, la respuesta inmune celular es la que está relacionada con la protección de la enfermedad, si bien cuando el hospedador se infecta produce también anticuerpos específicos. Las células dendríticas y macrófagos representan la primera línea de defensa que permite al hospedador activar mecanismos para contener la infección mientras la inmunidad adaptativa comienza a activarse. Las citoquinas resultantes de la activación de la respuesta innata orientan y modulan la respuesta adaptativa, que será responsable de contener la infección. En este sentido, la inmunidad protectora frente a la infección por *N. caninum* es iniciada por el eje interleuquina (IL)12 /interferón γ (IFN γ). Cuando los macrófagos y células dendríticas contactan con el patógeno, producen IL12, la cual polariza la diferenciación de los linfocitos TCD4 a un perfil Th1, productor de IFN γ . Esta citoquina es fundamental en la protección, particularmente en la etapa aguda de la infección por *N. caninum*, limitando la proliferación parasitaria en distintos tejidos y células (Innes et al., 1995). Adicionalmente, las células NK y linfocitos TCD8 juegan un rol clave en el control de las infecciones por parásitos intracelulares como *N. caninum*. Dichas poblaciones celulares, además de ser potentes productoras de IFN γ , eliminan células infectadas causando su muerte por apoptosis (Boysen et al., 2006).

Altos niveles de anticuerpos son detectables en los animales luego de la infección, los cuales perduran durante meses; sin embargo, su rol en la protección de la infección por *N. caninum* no es claro. Es posible que los anticuerpos actúen inhibiendo la invasión de las células blanco, en los momentos de la infección donde los taquizoítos se encuentran extracelularmente (Innes et al., 2002).

Tanto una primoinfección como una reactivación de una infección crónica por *N. caninum* en el momento de la preñez, constituyen una situación compleja a nivel inmunológico, ya que la hembra preñada debe, por un lado, intentar contener la infección a través de las citoquinas y mecanismos mencionados anteriormente, y, por otro lado, garantizar el buen término de la ges-

tación. Algunas citoquinas y mecanismos beneficiosos para intentar controlar la infección (respuesta pro-inflamatoria y generación de un perfil Th1), resultan perjudiciales para la unidad feto-placenta, antagonizando con el buen término de la preñez (Tangri & Ragupathy, 1993; Innes et al., 2005). Contrariamente, los tejidos de unión feto-placenta, producen citoquinas progestacionales características de la respuesta Th2 (IL4, IL10, factor transformante del crecimiento- β), fenómeno favorecido por los altos niveles de progesterona. Esta hormona inhibe la producción de óxido nítrico y factor de necrosis tumoral- α , como también la actividad de las células NK. De aquí surge un “dilema” para el sistema inmune de la hembra preñada. Por un lado, es necesaria una respuesta Th1 dominante para combatir la infección, resultando en la producción de citoquinas inflamatorias y perjudiciales para el feto. Por otra parte, la progesterona y otros mecanismos inmunomoduladores, inducen la producción de citoquinas de la respuesta Th2 que no se relacionan directamente con la protección, pero sí lo hacen con la posibilidad de continuar la preñez. A su vez, el momento de la gestación en que el parásito se encuentre activo, determinará, especialmente en los bovinos, la manifestación clínica de la enfermedad.

La capacidad del feto de desarrollar una respuesta inmune aumenta a medida que progresa la gestación. En bovinos, a partir del segundo tercio de la preñez, el feto es capaz de desarrollar tanto una respuesta inmune celular como humoral (mediada por anticuerpos). Por lo tanto, la inmunocompetencia del feto al momento de la infección por *N. caninum* determinará la severidad de la enfermedad y la carga parasitaria en los tejidos fetales, siendo ambas progresivamente menores a medida que la infección ocurre más tardíamente en la gestación. En bovinos, cuando la infección ocurre en el primer o segundo tercio de la preñez, se detecta *N. caninum* en varios tejidos fetales (cerebro, corazón, riñón y pulmón), mientras que sólo se detectan parásitos en el cerebro cuando la infección ocurre en el tercer trimestre de preñez, evidenciando la importancia de la edad fetal en la severidad de la enfermedad (Collantes-Fernández et al., 2006). Por lo tanto, una infección fetal hacia el final de la preñez, probablemente resulte en el nacimiento de terneros sanos, pero congénitamente infectados, que, de ser conservados para reposición en el rodeo, pueden mantener la infección de forma endémica.

Diagnóstico y observación

El diagnóstico de neosporosis se puede realizar a nivel individual (en un animal), a nivel poblacional (grupo de animales o rodeo) o bien a partir de muestras de tejidos infectados (por ejemplo, un feto abortado).

Los métodos **directos** utilizados para el diagnóstico de *N. caninum* son: la histopatología e inmunohistoquímica (HP/IHQ), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la observación de formas infectivas y el aislamiento. A continuación, se describen brevemente cada una de ellos.

La técnica de **HP** detecta cambios/lesiones asociadas a *N. caninum* en el tejido analizado. Las principales lesiones compatibles con *N. caninum* son: encefalomielitis multifocal no supurativa, miocarditis focal a difusa no supurativa, hepatitis periportal, neumonía intersticial, placentitis linfocítica multifocal (Campero et al., 1998; Anderson et al., 2000; Campero et al., 2020) (Fig. 3).

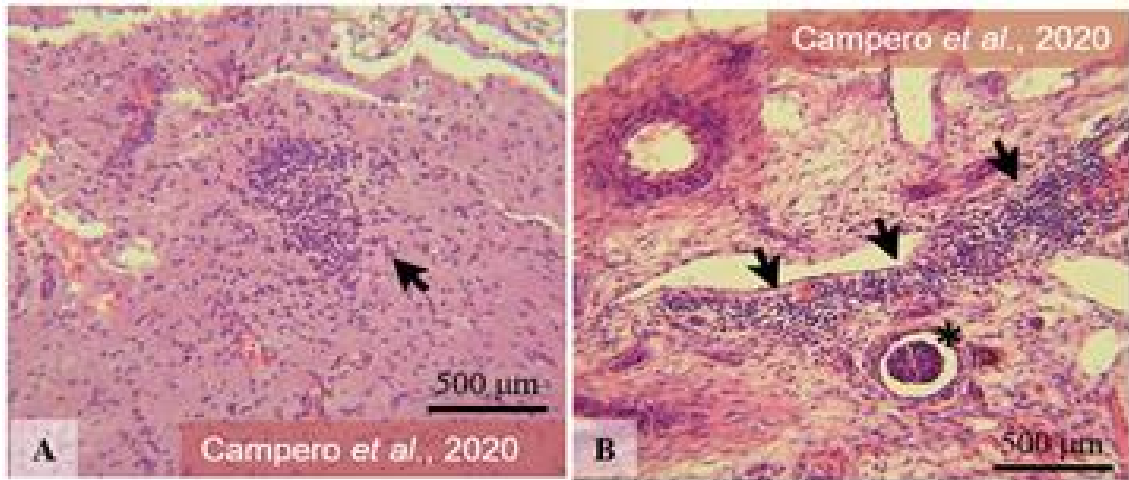


Figura 3. Microfotografías de lesiones histopatológicas halladas en un feto bovino (tinción hematoxilina eosina -H&E-, 100X). **(A)** Foco de gliosis (flecha) en corteza cerebral. **(B)** Hemorragia (asterisco) e infiltrado linfocítico intersticial (flechas) en riñón.

La **IHQ** es complementaria a la HP; se realiza a partir de las secciones donde se hallaron lesiones compatibles con *N. caninum*. La técnica requiere de sueros hiperinmunes anti-taquizoítos de *N. caninum* que evidencian específicamente las formas parasitarias infectivas (taquizoítos, *clusters* de taquizoítos, quistes tisulares). Tanto la HP como la IHQ son técnicas de sensibilidad variable pero esenciales para confirmar un diagnóstico de aborto por *N. caninum* (Wouda et al., 1997; Morrell et al., 2020).

Una técnica altamente sensible y específica que permite la identificación de ADN de *N. caninum* es la **PCR**. Se realiza a partir de ADN extraído de tejidos provenientes de fetos abortados o en muestras de líquido amniótico, sangre, leche, etc. y en heces del HD para la detección de ooquistes.

También es posible la **observación directa de formas infectivas**, ya sea para la detección de taquizoítos o quistes tisulares en improntas de tejidos (se puede facilitar la lectura con una tinción H&E, Giemsa, rapid Diff Quick®) o de ooquistes presentes en la materia fecal. En caso de detectar al microscopio formas infectivas compatibles con el protozooario, se debe confirmar que se trate efectivamente de *N. caninum*. Los quistes tisulares deben confirmarse mediante PCR o HP/IHQ, ya que podría tratarse de otro protozooario formador de quistes. En el caso de la detección de ooquistes por microscopía, es necesario realizar una PCR para confirmar que sean de *N. caninum*, debido a la existencia de ooquistes tipo-*Hammondia* que poseen similar tamaño y morfología.

El **aislamiento** de taquizoítos viables de *N. caninum* confirma el diagnóstico. Sin embargo, la metodología es laboriosa, requiere personal entrenado y depende de materiales y equipamiento frecuentemente no disponibles en los laboratorios donde se realiza el diagnóstico de rutina. Entre los factores condicionan un aislamiento exitoso se incluyen el tipo de tejido/muestra seleccionada

para aislamiento, su estado de conservación y la carga parasitaria presente. El protocolo estandarizado de elección debe incluir la multiplicación inicial de los taquizoítos de *N. caninum* en animales de laboratorio susceptibles a la enfermedad (ratones IFN γ knock-out, Nude), y el aislamiento *in vitro* utilizando medios de cultivo, líneas celulares y atmósferas adecuadas para su incubación (Campero et al., 2015b, 2021).

La caracterización genética de un aislamiento requiere del uso de marcadores moleculares específicos (ej. análisis multilocus de microsatélites, MLST). Los microsatélites también se utilizan en estudios epidemiológicos (Basso et al., 2010) y poblacionales (Regidor-Cerrillo et al., 2013).

Los métodos **indirectos** se fundamentan en la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* presentes principalmente en suero, pero también podrían buscarse en líquido amniótico, leche, entre otros. Las técnicas más utilizadas son la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzoinmunoensayos (ELISAs) indirectos y aglutinación, utilizando en algunos casos el *immuno-blot* como prueba confirmatoria. A continuación, se describen brevemente cada una de ellas.

La IFI ha sido ampliamente utilizada como prueba serológica diagnóstica de neosporosis (Dubey et al., 1988). La excitación con luz UV genera una fluorescencia que se interpreta como positiva cuando se aprecia de manera ininterrumpida en toda la superficie del taquizoíto (Fig. 4). La IFI permite titular sueros, de modo que es una herramienta útil para monitorear fluctuaciones de anticuerpos. Sin embargo, factores como la calidad del microscopio y tipo de luz utilizada, el conjugado y dilución empleada sumado a la experiencia del operador, son factores que sin lugar a dudas condicionarán los resultados y, por ende, la eficiencia de la IFI. Los puntos de corte deben ser estandarizados en cada laboratorio según sus propias condiciones, especie animal y objetivo del diagnóstico (Campero et al., 2018).

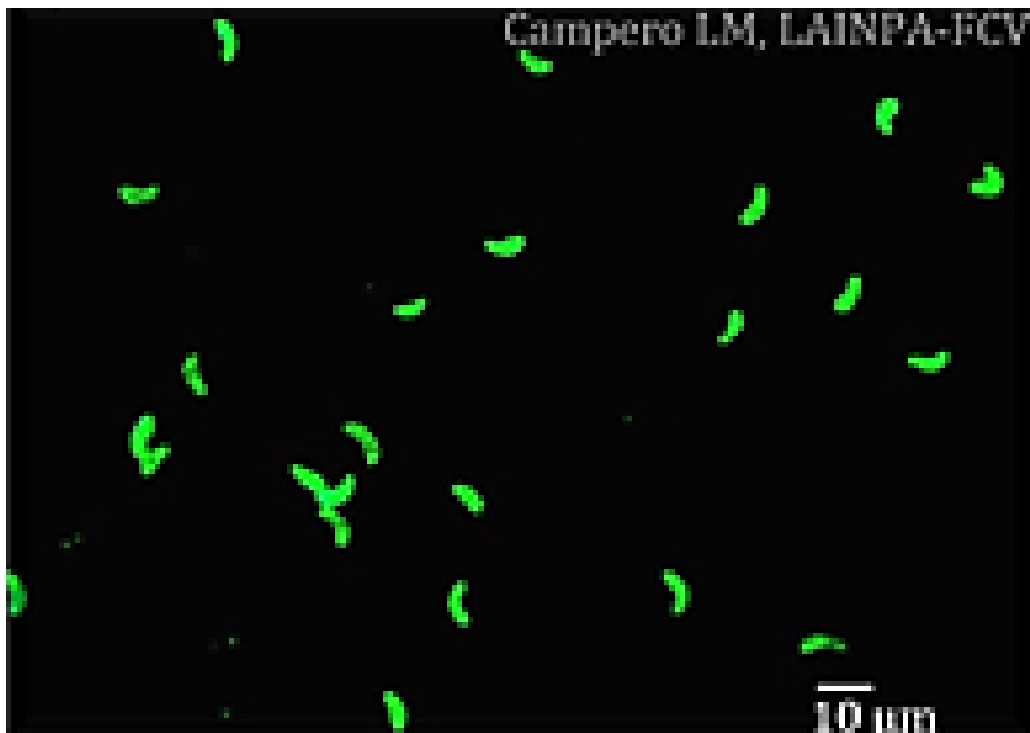


Figura 4. Microfotografía de IFI positiva en un suero bovino a título de corte 1:200.

En las pruebas de **ELISAs**, el antígeno conocido ya sea completo o tratado por diversos mecanismos, es usado para cubrir los pocillos de una policubeta. La ventaja del ELISA sobre la IFI radica en que el registro de la reacción se realiza de un modo objetivo por medio de un espectrofotómetro y la prueba puede ser automatizada. Además, es una prueba adecuada para analizar un gran número de muestras (Dubey & Schares, 2006). Existen distintos tipos de ELISAs: indirectos, de competición y de avidéz; disponibles comercialmente o como formatos caseros (*in-house*). En una infección reciente la avidéz es muy baja y progresivamente al madurar la respuesta inmune, los valores de avidéz aumentan, siendo más elevados en infecciones crónicas (Björkman et al., 1999). Por ello, los ELISAs de avidéz se valen de este principio para discriminar una infección reciente de una infección crónica. Es importante considerar que al adquirir kits comerciales o en el diseño de ELISAs de desarrollo propio, se deben estandarizar los títulos de corte según la zona geográfica donde serán utilizados (OIE, 2019). Así se refleja en los hallazgos de Campero et al. (2018) que detectaron una gran variación entre pruebas diagnósticas utilizadas de rutina para neosporosis bovina en Iberoamérica (IFI, ELISA comercial y ELISA *in-house*).

En la **aglutinación directa** se utilizan taquizoítos intactos tratados con formalina que aglutinan frente a la presencia de anticuerpos específicos en el suero problema. Debido a su sencillez y versatilidad, la prueba de aglutinación directa tiene el potencial de ser utilizada para el diagnóstico de distintas especies ya que no requiere del uso de un conjugado anti-especie, siendo aplicable para el diagnóstico en especies silvestres (Dubey & Schares, 2006).

El **immunoblot** (IB) es una prueba serológica que evalúa la inmunorreacción entre un antígeno separado según su peso relativo en una electroforesis (SDS-PAGE) e inmunotransferido a una membrana de nitrocelulosa o polivinildifluoreno y el suero problema. La lectura de resultados implica la detección visual de inmunorreacciones hacia los siguientes antígenos inmunodominantes (IDAs) en condiciones no reducidas: 19, 29, 30, 33 y 37 kDa. Se considera que una muestra es positiva cuando se registra reacción hacia ≥ 2 IDAs (Schaes et al., 1999; Campero et al., 2015a) (Fig. 5).

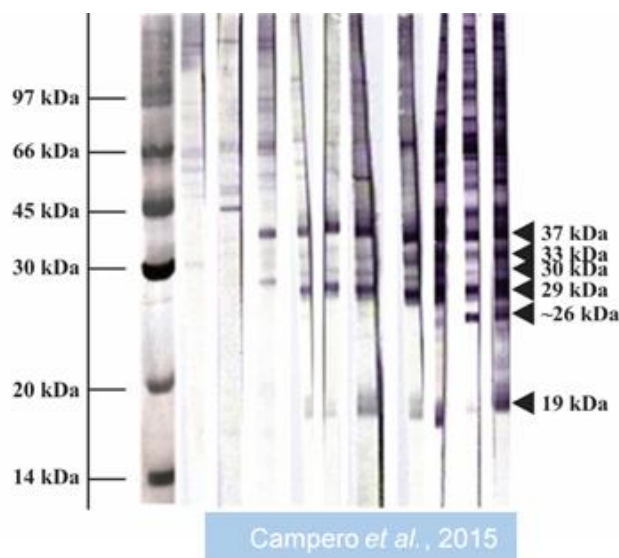


Figura 5. Patrón representativo de antígenos inmunodominantes para *N. caninum* con sueros bovinos positivos por IB en condiciones no reducidas.

Diagnóstico e interpretación de resultados: algunas consideraciones

Los ELISAs son muy utilizados para el diagnóstico de la neosporosis bovina debido a su automatización y objetividad en la interpretación de resultados. También se puede aplicar la IFI a un determinado título de corte. La prueba de IB no se realiza de rutina en el diagnóstico, aunque se ha demostrado que su uso en la serología fetal aumenta la sensibilidad del diagnóstico (Söndgen et al., 2001).

En bovinos, la serología en un animal individual ofrece limitada información, ya que muchos bovinos seropositivos no abortan y el nivel de anticuerpos varía mucho durante la gestación (Stenlund et al., 1999; Quintallina-Gozalo et al., 2000). Sin embargo, a nivel de rodeo, la serología aporta valiosa información. En un establecimiento donde se registren abortos y se sospecha de neosporosis, es recomendable realizar el sangrado de todas o bien de un número representativo de las hembras que abortaron y también acompañar con serología de igual número de hembras preñadas (compañeras). A través análisis estadísticos como χ^2 o la prueba exacta de Fisher, es posible evaluar la asociación entre aborto y seropositividad. Disponer de muestras de suero de las vacas que abortaron y de las que tuvieron partos normales, permite fortalecer los diagnósticos presuntivos obtenidos mediante serología (Moore et al., 2003).

El diagnóstico del aborto implica la ejecución de una batería de pruebas diagnósticas para obtener información que oriente el diagnóstico. Se debe realizar serología de la madre, HP/IHQ y PCR sobre el feto. La serología fetal debe interpretarse criteriosamente dado que un resultado negativo no necesariamente implica ausencia de infección. Factores como la maduración del sistema inmune del feto, el tiempo entre infección y aborto y la posible autólisis de inmunoglobulinas pueden enmascarar falsos negativos.

En el caso de perros, la prueba serológica más utilizada para el diagnóstico de neosporosis es la IFI, con un título de corte de 1:50, a título final. Si bien perros que eliminan ooquistes no necesariamente seroconvierten, una serología positiva en perros con signología clínica confirmaría el diagnóstico y permitiría interpretar la evolución de la enfermedad. También se utiliza la serología para evaluar la efectividad del tratamiento (Dubey, 2013).

Referencias

- Álvarez-García, G., Pereira-Bueno, J., Gómez-Bautista, M., & Ortega-Mora, L. M. (2002). Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Veterinary Parasitology*, 107(1-2), 15-27. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00091-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00091-2).
- Anderson, M. L., Andrianarivo, A. G., & Conrad, P. A. (2000). Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 417-431. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00117-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00117-2).
- Basso, W., Schares, S., Minke, L., Bärwald, A., Maksimov, A., Peters, M., Schulze, C., Müller, M., Conraths, F. J., & Schares, G. (2010). Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common

- source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2), 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.009>.
- Basso, W., Venturini, L., Venturini, M. C., Hill, D. E., Kwok, O. C., Shen, S. K., & Dubey, J. P. (2001). First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *Journal of Parasitology*, 87(3), 612-618. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0612:FIONCF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0612:FIONCF]2.0.CO;2).
- Björkman, C., Näslund, K., Stenlund, S., Maley, S. W., Buxton, D., & Ugglå, A. (1999). An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(1), 41-44. <https://doi.org/10.1177/104063879901100106>.
- Boysen, P., Klevar, S., Olsen, I., & Storset, A. K. (2006). The protozoan *Neospora caninum* directly triggers bovine NK cells to produce gamma interferon and to kill infected fibroblasts. *Infection and immunity*, 74(3), 953-960. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.953-960.2006>.
- Campero, C. M., Anderson, M. L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., & Poso, M. A. (1998). *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *The Veterinary Record*, 143(8), 228-229. <https://doi.org/10.1136/vr.143.8.228>.
- Campero, L. M., Gual, I., Dellarupe, A., Schares, G., Moré, G., Moore, D. P., & Venturini, M. C. (2020). Isolation of *Neospora caninum* from a beef cattle fetus from Argentina: Immunopathological and molecular studies. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 21, 100438. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100438>.
- Campero, L. M., Minke, L., More, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, D. P., Hecker, Y., Campero, C. M., Schares, G., & Venturini, M. C. (2015a). Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 295-301. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2015.07.002>.
- Campero, L. M., Moore, D. P., Echaide, I. E., Campero, C. M., & Venturini, M. C. (2021). Neosporosis bovina en Argentina: a 25 años del primer reporte en el país. *Revista Analecta Veterinaria*, 41(1), 056. <https://doi.org/10.24215/15142590e056>.
- Campero, L. M., Moreno-Gonzalo, J., Venturini, M. C., More, G., Dellarupe, A., Rambeaud, M., Echaide, I. E., Valentini, B., Campero, C. M., Moore, D. P., Cano, D. B., Fort, M., Mota, R. A., Serrano-Martínez, M. E., Cruz-Vázquez, C., Ortega-Mora, L. M., & Álvarez-García, G. (2018). An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 50(1), 75-84. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1401-x>.
- Campero, L. M., Venturini, M. C., Moore, D. P., Massola, L., Lagomarsino, H., García, B., Bacigalupe, D., Rambeaud, M., Pardini, L., Leunda, M. R., Schares, G., & Campero, C. M. (2015b). Isolation and molecular characterization of a new *Neospora caninum* isolate from cattle in Argentina. *Experimental Parasitology*, 155, 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.04.009>.
- Cole, R. A., Lindsay, D. S., Blagburn, B. L., Sorjonen, D. C., & Dubey, J. P. (1995). Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. *The Journal of parasitology*, 81(2), 208-211.
- Collantes-Fernández, E., Rodríguez-Bertos, A., Arnaiz-Seco, I., Moreno, B., Aduriz, G., & Ortega-Mora, L. M. (2006). Influence of the stage of pregnancy on *Neospora caninum* distribution,

- parasite loads and lesions in aborted bovine fetuses. *Theriogenology*, 65(3), 629-641. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.06.003>.
- Dubey, J.P. (2013). Neosporosis in dogs. Commonwealth Agricultural Bureaux International. <https://doi.org/10.1079/pAVSNR20138055>.
- Dubey, J. P., Hattel, A. L., Lindsay, D. S., & Topper, M. J. (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 193(10), 1259-1263.
- Dubey, J. P., Hemphill, A., Calero-Bernal, R., & Schares, G. (2017). Neosporosis in Animals. CRC Press, Boca Raton.
- Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L. R., Martins, J., Kwok, O. C., & Choudhary, S. (2011). Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 181(2-4), 382-387. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.018>.
- Dubey, J. P., & Schares, G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 140(1-2), 1-34. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.035>.
- Dubey, J. P., & Schares, G. (2011). Neosporosis in animals--the last five years. *Veterinary Parasitology*, 180(1-2), 90-108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>.
- Gondim, L. F., McAllister, M. M., Pitt, W. C., & Zemlicka, D. E. (2004). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal of Parasitology*, 34(2), 159-161. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.01.001>.
- Innes, E. A., Andrianarivo, A. G., Bjorkman, C., Williams, D. J., & Conrad, P. A. (2002). Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends in Parasitology*, 18(11), 497-504. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02372-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02372-3).
- Innes, E. A., Panton, W., Marks, J., Trees, A. J., Holmadhl, O. J. M., & Buxton, D. (1995). Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum* as shown by incorporation of 3H Uracil. *Journal of Comparative Pathology*, 113(1), 95-100. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(05\)80075-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(05)80075-1).
- Innes, E. A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macaldowie, C., Esteban-Redondo, I., & Buxton, D. (2005). The host-parasite relationship in bovine neosporosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1-2), 29-36. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.07.004>.
- King, J. S., Slapeta, J., Jenkins, D. J., Al-Qassab, S. E., Ellis, J. T., & Windsor, P. A. (2010). Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal of Parasitology*, 40, 945-950. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.01.008>.
- McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A., & McGuire, A. M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal of Parasitology*, 28(9), 1473-1478.
- Moore, D. P., Campero, C. M., Odeón, A. C., Chayer, R., & Bianco, M. A. (2003). Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*. 50(6), 304-308. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00673.x>.

- Morrell, E. L., Campero, C. M., Cantón, G. J., Odeón, A. C., Moore, D. P., Odriozola, E., Paolicchi, F., & Fiorentino, M. A. (2019). Current trends in bovine abortion in Argentina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39(1):12-19. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5668>.
- OIE. (2019). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. En: *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals* (pp. 1-18).
- Pare, J., Thurmond, M. C., & Hietala, S. K. (1996). Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 60(2), 133-139.
- Quintanilla-Gozalo, A., Pereira-Bueno, J., Seijas-Carballado, A., Costas, E., & Ortega-Mora, L. M. (2000). Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: Relationship infection-abortion and gestational antibody fluctuations. *International Journal of Parasitology*, 30, 900-906.
- Regidor-Cerrillo, J., Díez-Fuertes, F., García-Culebras, A., Moore, D. P., González-Warleta, M., Cuevas, C., Schares, G., Katzer, F., Pedraza-Díaz, S., Mezo, M., & Ortega-Mora, L. M. (2013). Genetic diversity and geographic population structure of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite genotyping analysis. *PLoS One*, 8(8), e72678. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072678>.
- Schares, G., Rauser, M., Zimmer, K., Peters, M., Wurm, R., Dubey, J. P., de Graaf, D. C., Edelhofer, R., Mertens, C., Hess, G., & Conraths, F. J. (1999). Serological differences in *Neospora caninum* associated epidemic and endemic abortions. *Journal of Parasitology*, 85(4), 688-694.
- Söndgen, P., Peters, M., Bärwald, A., Wurm, R., Holling, F., Conraths, F. J., & Schares, G. (2001). Bovine neosporosis: immunoblot improves foetal serology. *Veterinary Parasitology*, 102(4), 279-290. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00543-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00543-X).
- Staubli, D., Nunez, S., Sager, H., Schares, G., & Gottstein, B. (2006). *Neospora caninum* immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis. *Parasitology Research*, 99(6), 648-658. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0207-y>.
- Stenlund, S., Kindahl, H., Magnusson, U., Uggla, A., & Björkman, C. (1999). Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, 85(4), 227-234. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00120-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00120-X).
- Tangri, S., & Ragupathy, R. (1993). Expression of cytokines in placentae of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions. *Biology of Reproduction*, 49(4), 850-856. <https://doi.org/10.1095/biolreprod49.4.850>.
- Trees, A. J., & Williams, D. J. (2005). Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends in Parasitology*, 21(12), 558-561. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.09.005>.
- Wouda, W., Moen, A. R., Visser, I. J., & van Knapen, F. (1997). Bovine fetal neosporosis: a comparison of epizootic and sporadic abortion cases and different age classes with regard to lesion severity and immunohistochemical identification of organisms in brain, heart, and liver. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(2), 180-185. <https://doi.org/10.1177/104063879700900212>.