

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de Tesis realizado como requisito para obtener el título de
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

TÍTULO DEL TRABAJO: Perfil serológico de las infecciones naturales de bovinos por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum* y su relación con aspectos productivos.

AUTOR: Med. Vet. Gastón Andrés Moré

DIRECTOR: Dra Lucila Venturini

CODIRECTOR: Dra María Cecilia Venturini

LUGAR DE TRABAJO: Laboratorio de Inmunoparasitología, Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

MIEMBROS DEL JURADO:

Dr Carlos Alberto Fossati

Dr Pedro Steffan

Dra María Laura Vignau

2008

Dedicatoria

A la familia: a mis abuelos simplemente por ser como son, un ejemplo de vida; a mis viejos que me hicieron el aguante en todas mis decisiones, a Jero mi soporte informático y en especial a Romi, Agus y Juani que me alegran el día a día.

Agradecimientos:

La verdad que esta es una de las partes más difíciles de escribir, es tanta la gente que merece los agradecimientos, que se corren altos riesgos de olvidarse de alguien, así que espero mencionar a todos aquellos que de un modo u otro hicieron posible este trabajo.

En primer lugar y para no omitir nombres a todos los docentes y no docentes de la Cátedra de Parasitología y Enfermedades Parasitarias y del Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP, sin ellos habría sido muy difícil iniciar cualquier tipo de estudio, me incorporaron al grupo de muy buena manera y me guiaron todo el tiempo.

También a los docentes y técnicos de la Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas por su ayuda con la histopatología y con los cortes para la inmunohistoquímica.

Por otro lado agradezco a los propietarios y empleados de los establecimientos en los que realicé los muestreos para esta tesis, me permitieron obtener uno de los pilares fundamentales del trabajo, nada más y nada menos que las muestras.

También al CEDIVE por facilitarme una balanza mecánica para los pesajes de los terneros a campo y al INTA Balcarce por cederme sueros de fetos abortados.

A las Doctoras Lucila Venturini y María Cecilia Venturini debo agradecerles en primera instancia la confianza y paciencia que me tuvieron, y por sobre todo porque me guiaron siempre, dándome mucha seguridad en el camino de la investigación.

A "yaque" por las correcciones de edición propuestas para este manuscrito.

Por último y no por eso menos importante a toda mi familia, que fue siempre el soporte de todas mis tareas y decisiones.

Muchas gracias!

Índice

Citas bibliográficas correspondientes a publicaciones parciales del trabajo de tesis.....	VI
Índice de abreviaturas.....	VII
Resumen	1
Capítulo I: Introducción	4
1. Sarcocystosis	6
Historia	6
Sarcocystosis bovina.....	7
Etiología.....	7
Epidemiología	11
Patogenia, lesiones y curso clínico.....	13
Sintomatología en humanos	14
Diagnóstico	15
2. Neosporosis	19
Etiología	19
Ciclo evolutivo.....	20
Neosporosis bovina	23
Epidemiología y signología	23
Lesiones	24
Pérdidas en producción	25
Diagnóstico	26
3. Objetivos.	29
4. Hipótesis más relevantes	30
Capítulo II: Diagnostico de infecciones por <i>Sarcocystis cruzi</i> y <i>Neospora caninum</i> en bovinos.....	31
Introducción	32
Materiales y métodos.....	32
Resultados.....	35
Discusión	38
Capítulo III: Transmision transplacentaria y horizontal de <i>S. cruzi</i> y <i>N. caninum</i> en bovinos evaluadas mediante Inmunofluorescencia indirecta	41

Introducción	42
Materiales y Métodos	43
Resultados	45
Discusión:	48
Capítulo IV: Perfiles serológicos para las infecciones naturales por <i>S. cruzi</i> y <i>N. caninum</i> en terneros de cría	52
Introducción	53
Materiales y métodos	54
Resultados	56
Discusión:	60
Capítulo V: Diagnóstico serológico y molecular de <i>S. cruzi</i> y <i>N. caninum</i> en abortos y mortalidad neonatal	64
Introducción	65
Materiales y métodos	66
Resultados	67
Discusión	68
Capítulo VI: Conclusiones	70
Anexo: Técnicas empleadas	75
Referencias Bibliograficas.....	88
Fotografías.....	97

Citas bibliográficas correspondientes a publicaciones parciales del trabajo de tesis.

Moré G., Basso W., Bacigalupe D., Venturini M.C., Venturini L. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. 2008. Parasitology Research, 102: 671-675.

Índice de abreviaturas

ANOVA: test de análisis de varianza.

csp: cantidad suficiente para

dpi: días post infección

EDTA: ácido etilén-diamino-tetraacético

ELISA: Prueba Inmunoenzimática

GDP: ganancia diaria de peso

HD: hospedador definitivo

HI: hospedador intermediario

H&E: hematoxilina y eosina

IC: intervalo de confianza

IFI: inmunofluorescencia indirecta

Ig: inmunoglobulina

IHA: Inhibición de la hemoaglutinación

IHQ: Inmunohistoquímica

PBS: solución buffer salina de fosfatos

Pc: precalostro

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pH: potencial de hidrógeno, medida de acidez o alcalinidad de un medio.

RFLP: Polimorfismo de fragmentos de restricción (fragmentos de ADN)

rpm: revoluciones por minuto

sin.: sinonimia

SNC: sistema nervioso central

TBE: Tris- Borato-EDTA

Título:

Perfil serológico de las infecciones naturales de bovinos por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum* y su relación con aspectos productivos.

Resumen:

El objetivo principal de este trabajo fue el de trazar los perfiles serológicos de las infecciones por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum*, en terneros de cría, compararlos y relacionarlos con las vías de infección y con posibles pérdidas productivas.

Se muestrearon 90 bovinos de faena, que presentaron quistes de *Sarcocystis cruzi* en el 100 % de los miocardios. Se detectaron anticuerpos para *S. cruzi* en el 100% de los animales y para *N. caninum* en el 73% utilizando Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y 25 como título de corte.

Posteriormente, se examinaron por IFI sueros precalostro de 173 terneros de tambo y de sus madres; la transmisión transplacentaria de *S. cruzi* fue 1,7 % y la de *N. caninum* 14,8% en vacas con título < 400 y 94,8% en vacas con títulos \geq 400 . Todas las vacas con títulos \geq 400 para *N. caninum* al servicio mantuvieron ese rango al parto; este título podría usarse como predictor de transmisión vertical antes y durante la preñez. La transmisión horizontal se estimó en 98,6 % para *S. cruzi* y 47 a 50% para *N. caninum*. Los perfiles serológicos en terneros de 2 rodeos de cría, mostraron un aumento de los títulos para *S. cruzi*; y disminución de los títulos, siendo aún positivos en el último muestreo, para *N. caninum*. La transmisión horizontal de *N. caninum* fue entre 21,7 y 23%. La ganancia diaria de peso de terneros con títulos < 200 para *S. cruzi*, fue

superior a la de animales con título > 200. Se detectaron anticuerpos para *S. cruzi* en 1 ternero abortado y por PCR se detectó ADN de *N. caninum* en tejidos de fetos abortados y placentas de vacas que transmitieron la infección.

Los perfiles serológicos se relacionaron con las vías de transmisión, horizontal para *S. cruzi* y vertical para *N. caninum*, aunque para éste se detectó una alta frecuencia de transmisión horizontal en animales de tambo.

Palabras clave:

Neospora caninum, *Sarcocystis cruzi*, transmisión, producción, Inmunofluorescencia indirecta, PCR.

Title:

Serologic profile of *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* natural infections in cattle and its relation with production.

Abstract:

The objective of this study was to characterize serologic profiles for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* infections in calves and to evaluate their relationship with routes of infection and production losses.

Ninety bovines were sampled at slaughter, which all presented *S. cruzi* cysts in myocardium. In addition, all animals had antibodies to *S. cruzi* and 73% of animals had antibodies to *N. caninum*, as determined by indirect immunofluorescence antibody test (IFAT) using 25 as cutoff titer.

Subsequently, 173 serum samples were collected from dairy calves prior to drinking colostrum and from their dams and evaluated by IFAT to determine *S. cruzi* and *N. caninum* antibody titers. Vertical transmission was 1.7% for *S. cruzi*, 14.8% for *N. caninum* in cows with antibody titer <400 and 94.8% for *N. caninum* in cows with antibody titer ≥400. All cows with *N. caninum* antibody titer ≥400 at breeding had similar values at calving, suggesting that *N. caninum* antibody titer could potentially be used as a predictor of vertical transmission before and during pregnancy. Horizontal transmission was estimated at 98.6% for *S. cruzi* and 47 to 50% for *N. caninum*.

Serologic profiles in beef calves from 2 farms showed an increase in *S. cruzi* titers and a decrease in *N. caninum* titers. Horizontal transmission for *N. caninum* was 21.7 to 23%. Daily weight gain was higher in calves with *S. cruzi* titers <200 than in animals with *S. cruzi* titers >200. *Sarcocystis cruzi* antibodies were detected in one aborted fetus and *N. caninum* DNA was detected by PCR in tissues from aborted fetuses and placentas from cows that transmitted the infection vertically.

Serologic profiles were correlated with horizontal transmission for *S. cruzi* and with vertical transmission for *N. caninum*; however, frequency of *N. caninum* horizontal transmission was also high in dairy animals.

Keywords:

Neospora caninum, *Sarcocystis cruzi*, transmission, production, indirect
Immunofluorescence, PCR.

Capítulo I

Introducción

Introducción

Los protozoarios *Neospora caninum* y *Sarcocystis sp*, del Phylum Apicomplexa, son intracelulares y cumplen un ciclo biológico indirecto formando quistes en la musculatura y sistema nervioso central de los hospedadores intermediarios. Los bovinos son hospedadores intermediarios de *N. caninum*, *S. cruzi*; *S. hirsuta* y *S. hominis*, especies que se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo **(1, 2)**. Los perros son hospedadores definitivos de *N. caninum* y *S. cruzi*, ambas especies son patógenas para los bovinos y pueden ocasionar pérdidas en la producción **(1-3)**. Los gatos son los hospedadores definitivos de *S. hirsuta*; esta especie es menos patógena y ocasiona pérdidas de menor importancia. *S. hominis* es de interés en salud pública, se considera apatógena para los bovinos pero es patógena para los seres humanos, que son sus hospedadores definitivos **(2, 4)**.

Los protozoarios Apicomplexa tienen núcleo vesicular, complejo apical formado por microtúbulos subpeliculares, un conoide, anillos polares anteriores y posteriores, roptrias, numerosas micronemas; El citoplasma con mitocondria tubular, complejo de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, cuerpos lipídicos, electrodensos y de amilopectina; membrana celular con microporo. Los protozoos se alojan en vacuolas parasitoforas y se dividen por endodiogenia o endopoligenia. En los animales infectados se pueden hallar grupos de organismos y quistes tisulares.

1. Sarcocystosis

Se define como Sarcocystosis a la infección ocasionada por protozoos Apicomplexa del género *Sarcocystis*, que en general cursa de una forma leve o asintomática, aunque puede ocasionar también signología sistémica, decaimiento, anemia, trastornos neurológicos, aborto y hasta la muerte de los animales **(2, 5, 6)**.

Estos protozoos presentan un ciclo indirecto obligado, generalmente alternando herbívoros como hospedadores intermediarios y carnívoros como hospedadores definitivos, aunque pueden ser intermediarios otros mamíferos, aves, peces y animales poiquiloterms **(2)**. En los hospedadores intermediarios se multiplican asexualmente y forman quistes en los músculos, lo que dio origen al nombre del género (del griego *sarkos*: músculo, *kystis*: vesícula o quiste). En los hospedadores definitivos los protozoos se multiplican sexualmente en el intestino, y se eliminan con las heces esporocistos u ooquistes. Estos son la fuente de infección para los HI, que los ingieren junto con el alimento o el agua.

En general la infección en los hospedadores definitivos cursa de manera asintomática, excepto en las ocasionadas por especies en las que el humano es el hospedador definitivo, en donde si se reporta sintomatología **(4)**.

Historia

El primer hallazgo de quistes tisulares fue documentado por Miescher, en músculos esqueléticos de ratón (*Mus musculus*) en Suiza en 1843, a partir de ese momento los quistes detectados en la musculatura de diversas especies fueron nombrados como

tubos de Miescher. En 1882 se introduce el nombre del género *Sarcocystis* y desde ese momento muchos protozoos fueron nombrados en base a la estructura de los quistes en la musculatura de una amplia variedad de hospedadores. Fue recién en 1972 que se describe el ciclo biológico de estos protozoos y se comprende la naturaleza y origen de estos quistes musculares.

Un mismo hospedador intermediario puede infectarse con varias especies de *Sarcocystis* y se observa en general que las especies que tienen cánidos como hospedadores definitivos son las más patógenas **(2, 7)**.

Sarcocystosis bovina

La sarcocystosis bovina es una parasitosis de distribución mundial, causada por *S. cruzi*, *S. hirsuta* y/o *S. hominis*. La infección frecuentemente sigue un curso crónico y asintomático, con formación de quistes tisulares, aunque puede cursar de forma aguda con sintomatología sistémica o presentarse como una miositis eosinofílica asociada a la presencia de los quistes **(2, 5, 8)**. La signología y patogenicidad varían según la especie de *Sarcocystis* causal de la infección.

Etiología

Los cánidos son hospedadores definitivos de *S. cruzi* (Sinónimo *S. bovicanis*), los félidos de *S. hirsuta* (Sin. *S. bovifelis*) y los primates de *S. hominis* (Sin. *S. bovihominis*) **(2, 7)**. Pertenecen al *phylum Apicomplexa*, clase *Sporozoa*, orden *Eucoccida*, familia *Sarcocystidae* subfamilia *Sarcocystinae* **(9)**.

Ciclo evolutivo de *S. cruzi* (Hasselmann 1926)

Los cánidos (HD) se infectan al ingerir tejidos con quistes tisulares infectantes, o sea conteniendo bradizoítos, éstos se liberan en su intestino, penetran en las células caliciformes del intestino delgado, al cabo de unas horas se produce la gametogonia y luego la formación de ooquistes inmaduros. La maduración o esporogonia de los ooquistes ocurre en la lámina propia del intestino. Los ooquistes presentan una pared quística delgada que en la mayoría de los casos se rompe, liberando 2 esporocistos con 4 esporozoitos cada uno que pasan al medio ambiente con la materia fecal. La prepatencia es de 9 a 16 días. La eliminación no es continua y la patencia es larga, de más de 60 días. Fayer en 1977 evidenció que caninos infectados experimentalmente eliminaron una gran cantidad de esporocistos entre los días 15 y 30 posinfección, con un pico de eliminación entre los días 23 y 24 posinfección. La cantidad de esporocistos eliminada fue entre 861000 y 20 millones por perro (en 40 días), y fue mucho mayor en perros infectados con músculo cardíaco **(10)**.

Los bovinos (HI) ingieren los esporocistos presentes en el agua o el pasto, en su intestino se liberan los esporozoitos, lo atraviesan, y se multiplican rápidamente, por endopoligenia, libres dentro del citoplasma de células endoteliales. Esta primera merogonia tiene lugar en células endoteliales de arteriolas mesentéricas y de ganglios linfáticos mesentéricos entre los 7 y 21 dpi, los merontes maduros aparecen entre 15 y 25 dpi, miden 34-50 X 15-24 μm , pueden contener entre 100 y 350 merozoitos de 5,5-7 x 1 μm cada uno, y que carecen de roptrias **(2, 11)**. Luego se liberan los merozoitos de esa primera merogonia e invaden células endoteliales de capilares de todo el organismo, principalmente riñones y músculos esqueléticos, y desarrollan una segunda

merogonia entre los 19 a 46 dpi. Es durante esta fase de destrucción de células endoteliales que podría llegar a producirse la sintomatología de la sarcocystosis aguda en bovinos. Los merozoitos producto de la segunda merogonia pueden realizar una tercera merogonia dentro de leucocitos. Cumplida esa etapa de multiplicación rápida, los merozoitos ingresan en células musculares de miocardio, células de Purkinje cardíacas, músculos esqueléticos, y también pueden ingresar a músculos lisos y neuronas, en donde se reproducen lentamente dentro de vacuolas parasitoforas formando los quistes tisulares **(12)**. Al comienzo de esta multiplicación lenta, dentro del quiste, solo hay células redondeadas denominadas metrocitos, que se dividen por endodiogenia. A medida que pasa el tiempo, los metrocitos son reemplazados por bradizoítos que tienen la típica forma de banana (miden 14 x 3 μm aproximadamente), y sólo se encuentran metrocitos en la periferia del quiste. Al cabo de 2-3 meses las únicas células presentes dentro de los quistes son bradizoítos, que son las formas infectantes para el hospedador definitivo.

Los quistes tisulares de *S. cruzi* son alargados y tabicados con paredes delgadas de menos de 1 μm , y miden de 300 a 800 μm **(2, 12)**.

Ciclo evolutivo de *S. hirsuta* (Muolé 1888)

Dubey en 1982 desarrolló el ciclo de *S. hirsuta* mediante la inoculación experimental de terneros, con esporocistos obtenidos de materia fecal de gatos. A los 7 días post inoculación, aparecieron esporozoitos libres y dentro de leucocitos en arterias asociadas a linfonódulos, y en células endoteliales de arterias mesentéricas.

La primera generación de merontes se encontró entre los 7 y 23 dpi en arterias asociadas a linfonódulos del intestino. Los merontes maduros (7-10 dpi) midieron alrededor de 37 x 22 μm y presentaron más de 100 merozoitos, de 5,1 x 1,2 μm cada uno. Se encontraron merozoitos libres en sangre periférica a los 11 dpi.

La segunda generación de merontes se ubicó en capilares de músculos estriados y corazón, entre los 15 y 23 dpi, los merontes maduros a partir de los 15-16 dpi midieron 14 x 6,5 μm conteniendo de 3 a 35 merozoitos de 4 x 1,5 μm cada uno. Se evidenciaron merozoitos individuales entre las miofibrillas y dentro de macrófagos tisulares en músculos entre los 16 y 23 dpi.

Los quistes comenzaron a formarse a partir de los 25 hasta los 75 dpi, en músculos estriados pero no en corazón; el órgano más severamente afectado fue el esófago. A los 30 dpi los quistes contenían 2 metrocitos. A los 62 dpi los quistes midieron más de 550 μm de largo x 35 μm de ancho y contienen solo metrocitos; la pared gruesa, de más de 3 μm , y con estriaciones cruzadas. Los bradizoitos se desarrollaron entre los 62 y 75 dpi. Los quistes maduros midieron más de 800 μm de largo y la pared sobrepasó las 6 μm de espesor.

Se alimentaron gatos con los tejidos infectados de los terneros y evidenciaron que los quistes eran infectantes a los 75 dpi. Los gatos eliminaron esporocistos entre los 8 y 10 días post-ingestión.

Los quistes de *S. hirsuta*, si bien pueden aparecer en toda la musculatura, se presentan con mayor frecuencia en músculo esofágico, son de pared gruesa (más de 6 μm) y pueden medir hasta 1 cm originando decomisos **(13, 14)**.

Ciclo evolutivo de *S. hominis* (Railliet y Lucet 1891)

En la infección experimental de terneros con esporocistos de *S. hominis* realizada por Dubey y col en 1988, no se detectaron los estados evolutivos intermedios, solo encontraron algunos merozoitos en macrófagos, presentes en lesiones de miocardio, a los 24 dpi. Los quistes titulares maduros fueron detectados a los 111 y 222 dpi, en musculatura esquelética y esofágica, midieron hasta 950 μm y presentaron pared gruesa. También encontraron un quiste tisular de *S. hominis* inmaduro en corazón a los 222 dpi. Los quistes tisulares de *S. hominis* miden de 600 μm a 3 mm, presentan pared gruesa (de 2 a 7 μm) y pueden encontrarse en todos los músculos del organismo **(2, 15)**.

Todos los quistes tisulares, aún los macroscópicos, permanecen intracelulares y pueden perdurar años, hasta que un carnívoro ingiera los músculos o tejidos infectados y se complete el ciclo biológico **(2)**.

Epidemiología

La infección ocasionada por *Sarcocystis* sp en bovinos se ha detectado con elevadas tasas de prevalencia alrededor del mundo, de hasta el 100% en animales muestreados en EEUU y Holanda **(2, 16)**, 98 % en Nueva Zelanda **(17)**, 97% en Bélgica **(18)** 97,8 % Irak **(19)**; 90% en Mongolia **(20)**, 82% en Etiopía **(21)**, de 9 % a 87% en diversas regiones de Australia **(22)**; en los trabajos en donde se identificaron las especies, *S. cruzi* fue la más prevalente.

En Argentina Bertero y col en 1980, y Moriena y col en 1989 reportaron tasas de infección entre 79 y 100% mediante la detección de quistes musculares del género *Sarcocystis* en bovinos de matadero **(23, 24)**.

La prevalencia de quistes en los tejidos aumentaría con la edad de los animales **(22)**. El tejido muestreado es de suma importancia para determinar la prevalencia, ya que corazón y esófago son los órganos más intensamente infectados por *S. cruzi*. En un estudio realizado en muestras de lomo, las prevalencias detectadas fueron bajas: 6,31% en carne de Japón, 36,78% en carne de EEUU y 29,49% en carne australiana **(25)**.

En muestreos de carnes enlatadas la prevalencia también fue baja, se reportaron tasas de 6,25% en carnes de Brasil y 23,44% en carne de Argentina. El 92,65% de los quistes detectados presentó pared fina y el resto, pared gruesa, no siendo identificada la especie en estos últimos **(26)**.

La prevalencia de *S. hirsuta* y *S. hominis* es alta en distintas partes del mundo **(2, 17, 27)**. Pena y col. en 2001, reportaron la presencia de *S. hominis* en 46 de 50 muestras de carne picada de Brasil, muestreadas en establecimientos de comida árabe y sintomatología en 6 de 7 humanos voluntarios que ingirieron la carne cruda **(28)**.

En Argentina no se han comunicado tasas de prevalencia de las especies de *Sarcocystis* con quistes de pared gruesa (*S. hirsuta* y *S. hominis*), y solo un reporte menciona su presencia en muestras de carne enlatada **(26)**.

Patogenia, lesiones y curso clínico

La sarcocystosis generalmente cursa en forma subclínica aunque pueden presentarse casos con sintomatología evidente. Los terneros infectados experimentalmente con *S. hominis* manifestaron fiebre y algunos presentaron linfadenitis, hepatitis y miocarditis. **(15)**. Se la considera una especie poco patógena para el bovino, aunque recientemente, se reportó miositis eosinofílica asociada a quistes de *S. hominis* **(29)**.

Las infecciones experimentales con *S. hirsuta* causaron, durante el desarrollo de la primera generación de merontes en arteriolas del intestino delgado, mesenterio y ganglios mesentéricos, necrosis isquémica de los tejidos irrigados. El desarrollo de la segunda generación de esquizontes en capilares de los músculos estriados estuvo asociada con necrosis, edema y miositis no supurativa en el corazón y otros músculos **(13, 30)**.

Sarcocystis cruzi es la especie más patógena para el bovino, en las infecciones experimentales de terneros con más de 200.000 esporocistos, se han observado anemia, anorexia, fiebre intermitente, diarrea, debilidad muscular generalizada, pérdida de pelo alrededor de los ojos, en la punta de la cola y en el cuello; pérdida de peso y muerte a los 30 días de la ingestión de los esporocistos. Las lesiones consistieron en hemorragias seguidas por hepatitis, miocarditis y miositis no supurativas **(2)**. En infecciones naturales los hallazgos fueron similares y se ha reportado la presencia de miositis eosinofílica asociada a la presencia de quistes tisulares **(5, 8)**. En las vacas puede causar reducción en la producción de leche, pérdida de estado, disnea y abortos, signología que en conjunto fue descrita como la enfermedad de Dalmeny **(2, 31-35)**.

Se ha demostrado que en infecciones experimentales, durante el período agudo de la enfermedad puede afectar la coagulación sanguínea de manera dosis dependiente **(36)**.

La sintomatología descrita es ocasionada por la multiplicación rápida de merozoítos durante la segunda merogonia, cuando se ingieren grandes cantidades de esporocistos.

Si la cantidad de esporocistos ingeridos es baja, que es lo más frecuente en condiciones naturales, la infección cursa en forma inaparente **(2)**.

Dauguschies y col en el 2000 demostraron que terneros experimentalmente infectados presentaban una menor ganancia de peso que los controles, aunque no se vio afectada la calidad de la carne al sacrificio, en cuanto a PH, color y brillo, rigor, capacidades de retención y absorción de agua **(37)**. Hasta el momento se desconoce si estas pérdidas registradas en infecciones experimentales ocurren también en infecciones naturales.

Dado que la prevalencia en bovinos es tan alta, se puede suponer que hay casos clínicos o subclínicos insuficientemente diagnosticados, y que podrían ocurrir algunas de las manifestaciones propias de la enfermedad, entre ellas abortos y disminución de la ganancia de peso.

Sintomatología en humanos

La infección causada por *S. hominis* es considerada zoonótica, ya que completa el ciclo vital en el intestino de los humanos, aunque es de menor patogenicidad que la causada por *S. suis*, presente en carnes de cerdo **(4)**.

La ingesta de carne cruda o insuficientemente cocida conteniendo quistes de *S. hominis* puede ocasionar sintomatología abdominal tal como náuseas, dolor abdominal, vómitos y diarrea que comienzan 6 horas después de la ingestión y duran unas 36 horas. En ciertos casos, cuando se ingirieron grandes cantidades de quistes, la sintomatología fue

más severa. Siguiendo a los síntomas, unos 5 a 15 días posingesta, aparecen esporocistos en las heces. La sintomatología descrita ha sido reportada sólo en humanos voluntarios infectados experimentalmente **(4, 28)**.

Diagnóstico

Siendo la presentación de la sarcocystosis generalmente asintomática y que los casos clínicos presentan signos inespecíficos, el diagnóstico clínico es poco factible. En general se recurre principalmente a técnicas parasitológicas y serológicas para arribar al diagnóstico.

Diagnóstico parasitológico:

Durante el curso agudo de la enfermedad se puede hacer el diagnóstico poniendo en evidencia los esquizontes en las células endoteliales de ganglios linfáticos, haciendo raspado y tinciones o bien preparados histológicos **(2, 38)**.

En el curso crónico es posible identificar las especies al microscopio, por la morfología de los quistes tisulares. Con microscopía óptica de tejidos fijados y teñidos (hematoxilina –eosina) o en fresco, se pueden distinguir quistes de pared gruesa, de 2 a 7 μm (*S. hominis*, *S. hirsuta*) de los de pared delgada, de menos de 1 μm (*S. cruzi*) **(2, 7)**. Por microscopía electrónica, se pueden diferenciar las tres especies en base a la ultraestructura de la pared de los quistes **(15, 39, 40)**. Los quistes de *Sarcocystis* sp además, se diferencian de los de otros protozoarios como *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*, porque hay trabéculas en su interior.

En general se asume que los quistes a procesar deben estar refrigerados para la observación en fresco y fijados en formol o fijadores específicos para microscopía óptica o electrónica, pero existe un reporte en que la congelación de quistes tisulares en músculos de cerdo, a -20°C durante 30 días no alteró la ultraestructura de la pared y permitió la identificación de la especie **(41)**.

La digestión artificial de tejidos permite la observación de bradizoitos liberados de los quistes, lo que la hace una técnica muy sensible ya que se utilizan varios gramos de tejidos, pero no permite la identificación de las especies ya que se pierden los caracteres diagnósticos de la pared de los quistes **(2, 42)**. Se puede realizar una homogenización de tejidos en PBS o solución fisiológica, para poner en evidencia quistes o segmentos de los mismos **(17, 28)**.

Diagnóstico serológico:

La respuesta inmunológica generada por la infección es considerada específica del género *Sarcocystis*, dando reacciones cruzadas entre especies heterólogas **(42-44)**. La inmunidad generada por la infección previene los signos en reinfecciones experimentales, pero no elimina los organismos y probablemente no impida que se formen nuevos quistes **(2, 45)**.

Los anticuerpos circulantes, especialmente Ig G, comienzan a detectarse unos 30 a 45 días posinfección, hacen un pico a los 90 dpi, y luego tienden a mantenerse elevados durante al menos 6 meses **(42, 46)**. Los métodos serológicos más utilizados son las pruebas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Prueba inmunoenzimática (ELISA) e Inhibición de la hemoaglutinación (IHA) **(42, 43, 46, 47)**. Con la técnica de IHA se

detectaron títulos de anticuerpos de hasta 39000 en animales con signos clínicos de Sarcocystosis **(5, 42)**. La prueba de IFI utiliza merozoitos enteros como antígeno, y presenta una alta sensibilidad y especificidad, no detectándose reacciones cruzadas en infecciones experimentales de bovinos con *S. cruzi*, *N. caninum* y *T. gondii* **(48, 49)**. En cambio algunos ELISAs con lisados de bradizoitos como antígeno si presentan algunas reacciones cruzadas entre estas especies **(44, 48, 49)**.

No se registran trabajos en los que se evalúe la tasa de transmisión transplacentaria para *Sarcocystis* en fetos o terneros. Hasta el momento, en nuestro país, no se practica ningún tipo de diagnóstico serológico para Sarcocystosis. La detección de anticuerpos por IFI en terneros precalostro, permitiría identificar a los animales infectados naturalmente por vía transplacentaria. El seguimiento serológico y el trazado de un perfil serológico en terneros y observar su evolución en la ganancia de peso, permitirían evaluar posibles pérdidas productivas en explotaciones controladas de nuestro país.

Diagnóstico molecular:

La técnica de PCR se puede utilizar para poner en evidencia la presencia de especies de *Sarcocystis* en tejidos, aún en fases tempranas de la infección, detectando ADN específico de estos protozoos **(50-52)**. Es factible la realización de PCR y corte con enzimas de restricción para diferenciar las especies **(53)**. Debido a que es una técnica costosa, no se utiliza de rutina para el diagnóstico en bovinos ya que se obtienen buenos resultados con los métodos antes expuestos. Si puede ser un complemento a la hora de determinar la etiología de abortos y reemplazar a la microscopía electrónica en la identificación de especies.

De todos los métodos expuestos la técnica de observación histológica es la menos sensible, debido a que registra un mayor número de falsos negativos **(2, 16, 18)**. El diagnóstico de abortos por *Sarcocystis* se ha basado en el hallazgo de los organismos en cortes histológicos de tejidos fetales, sin embargo, y como ocurre en otras infecciones por protozoarios, puede que no se los halle en los cortes examinados **(31-33)**. La detección de anticuerpos anti-sarcocystis o del ADN del protozoo en fetos abortados podría estar relacionada con la ocurrencia de abortos por esta etiología.

2. Neosporosis

La neosporosis es una parasitosis que afecta a numerosas especies y está distribuida mundialmente; es de reciente descripción, recién en 1984 Bjerkas y col y Dubey y col en 1988 encuentran asociado a meningoencefalitis y miositis en cachorros caninos, un protozoo similar a *T. gondii* pero que no reaccionaba con los anticuerpos anti *T. gondii* y al que denominaron *Neospora caninum* (54, 55). La Neosporosis ocasiona principalmente muerte neonatal y signología nerviosa en los caninos y abortos en los bovinos.

Etiología

Neospora caninum fue aislado en cultivo celular y la reproducción experimental de enfermedad se completó en caninos en 1988, aislamiento que se denominó Nc 1 (55). En 1989 Thilsted y Dubey reportaron el hallazgo de organismos similares a *N. caninum* en tejidos de fetos bovinos abortados en Nuevo México, EEUU, y fueron los primeros en considerar a este protozoo como causal de abortos (56). Anderson y col. y Barr y col. en 1991 demostraron que *N. caninum* era una de las principales causas de aborto en los bovinos de California (57, 58). Estudios posteriores confirmaron que los aislamientos a partir de bovino y canino representaban la misma especie (59) y motivaron la redescrición y diferenciación de otros coccidios, por Dubey y col en 2002 (60). Se la considera actualmente perteneciente al phylum *Apicomplexa*, clase *Sporozoa*, orden *Eucoccida*, familia *Sarcocystidae*, subfamilia *Toxoplasmatinae* (9).

Ciclo evolutivo

El ciclo evolutivo es indirecto, se ha demostrado tanto natural como experimentalmente que los perros (*Canis familiaris*) son los hospedadores definitivos (HD) **(3, 61, 62)** como así también el coyote (*Canis latrans*) **(63)**. Los HD después de ingerir tejidos que contienen quistes eliminan con sus heces ooquistes sin esporular de 10 a 12 micras, similares a los de *Toxoplasma gondii* y *Hammondia* sp, que esporulan en el medio ambiente luego de 1 a 3 días **(60, 62)**. Aún no se conoce con exactitud el ciclo intestinal en los caninos, aunque según datos experimentales la prepatencia es de 5 a 13 días y la patencia 1 a 3 semanas aproximadamente y con eliminación intermitente en algunos casos **(62, 64)**.

Neospora caninum posee un amplio rango de hospedadores intermediarios: perros, coyotes, zorros, mapaches, bovinos, búfalos, ovinos, caprinos, ciervos, camélidos, equinos, rinocerontes, liebres, leones y guepardos. Experimentalmente se logró la infección de ratones, ratas, meriones, perros, zorros, coyotes, gatos, cerdos, conejos, primates, cabras, ovejas, y bovinos tanto por vía subcutánea, intraperitoneal, intramuscular y oral **(65, 66)**. En el perro se cumplen la fase intestinal como la extraintestinal del ciclo desempeñando el rol de hospedador definitivo e intermediario. El bovino es el HI más importante y en el que se producen signos más relevantes y pérdidas a nivel productivo. Tanto los HD como los HI pueden infectarse por la vía horizontal mediante la ingesta de ooquistes, o por la vía vertical o transplacentaria mediante el pasaje de taquizoitos a través de la placenta.

La infección por la vía horizontal ocurre al ingerir ooquistes esporulados, que en el tracto intestinal pierden la pared ooquistica y liberan los esporozoitos, estos atraviesan

la pared intestinal y se produce una multiplicación asexual (merogonia) extraintestinal, con formación de taquizoítos (merozoitos de división rápida) en diversos órganos y tejidos, destruyendo las células infectadas y apareciendo libres en sangre (parasitemia) durante la fase aguda de la infección. En etapas posteriores los taquizoitos penetran en células de tejidos neuromusculares, continúan la merogonia sin destruir la célula hospedadora, dando lugar a bradizoitos (merozoitos de división lenta) contenidos en quistes tisulares. Los taquizoítos pueden hallarse agrupados en células nerviosas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales de capilares y vasos, miocitos, epitelio tubular renal, hepatocitos, etc **(60)**. Los quistes tisulares hallados en tejido nervioso y en los músculos, son esféricos u ovals, de 20 a 107 μm , de pared lisa y de hasta 4 μm de espesor, dependiendo de la antigüedad de la infección, mientras que en los fetos y los terneros el espesor, no supera las 2,5 μm **(58, 60, 67, 68)**. Hasta los 1998 la única vía de transmisión conocida era la transplacentaria, de especial importancia en los bovinos **(69)**. Recientemente se han propuesto dos tipos de transmisión: la transmisión transplacentaria endógena (TT endógena) y la transmisión transplacentaria exógena (TT exógena)**(70, 71)**. En las hembras infectadas crónicamente, los cambios inmunológicos durante la preñez liberarían bradizoitos de los quistes, que comenzarían a producir taquizoitos que reactivarían la infección, produciendo una parasitemia que resultaría en la infección del feto **(65)**. Este tipo de transmisión respondería a una TT endógena. En el caso de que una hembra adquiriera una infección horizontal durante la preñez, la parasitemia propia de la fase aguda daría lugar a la infección del feto, denominándose a este tipo de transmisión, transplacentaria exógena **(70, 71)**.

La infección no ocurriría en etapas tempranas del desarrollo embrionario, por lo que la transferencia embrionaria sería una estrategia de control (72, 73).

Algunos autores sostienen la posibilidad de la transmisión venérea de *N. caninum*; debido a la detección, por PCR, de semen positivo en los toros; y a la infección experimental de vaquillonas por vía intrauterina, con semen contaminado (74-77). Otros autores consideran que es improbable que altas dosis infectantes de taquizoitos aparezcan en el semen y que pueda darse este tipo de transmisión en bovinos tanto en monta natural como en inseminación artificial (78, 79).

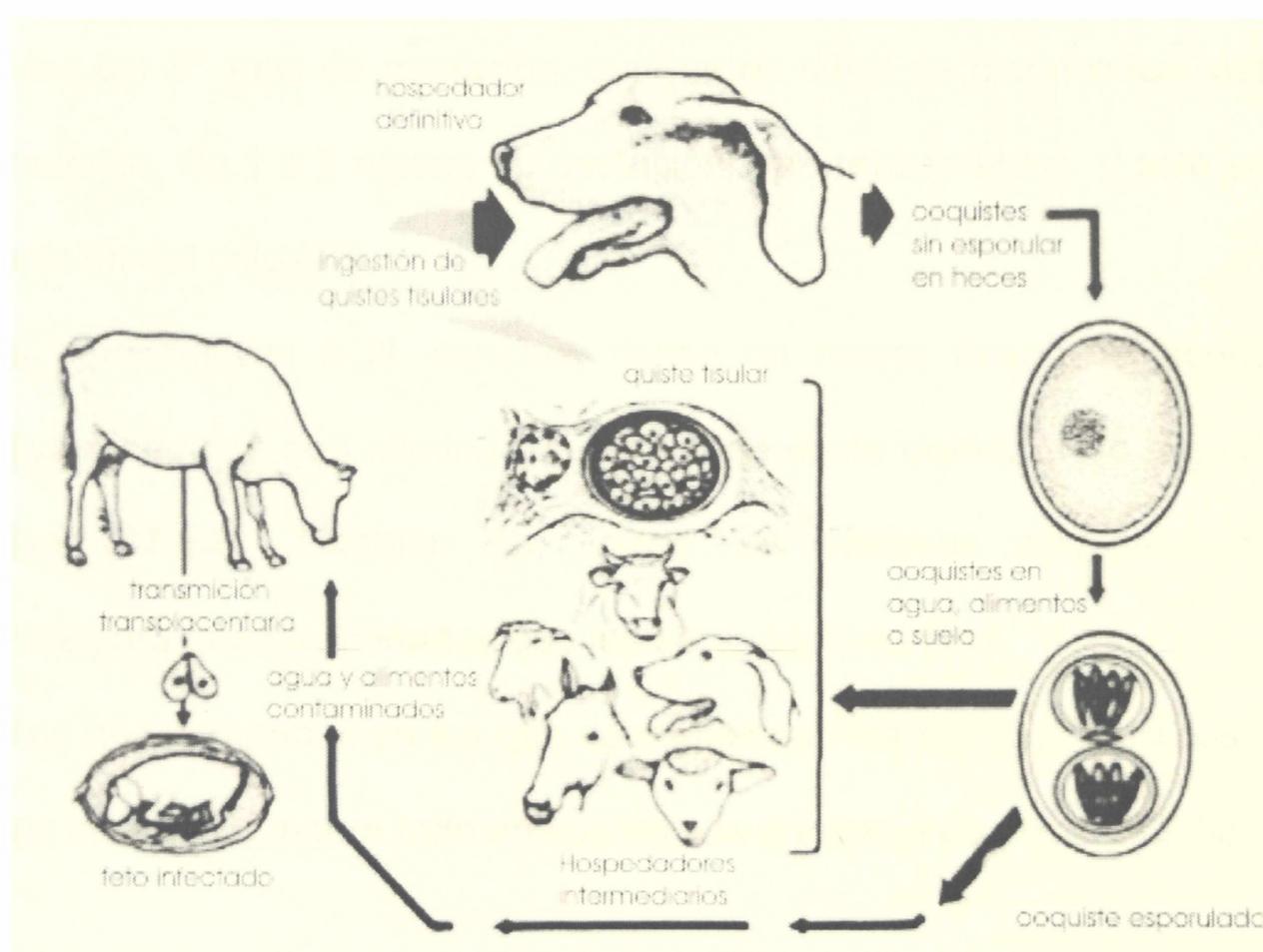


Figura 1: Ciclo evolutivo de *N. caninum*. Tomado y adaptado de Dubey y col 1999(80).

Neosporosis bovina

La neosporosis es considerada una de las principales causas de aborto en las vacas de tambo en varios países del mundo, incluida la Argentina, como así también causal de abortos en rodeos de cría **(65, 81-84)**.

Neospora caninum puede ocasionar abortos en las vacas de cualquier edad, y los mismos puede ocurrir desde los 3 meses de gestación hasta el final de la misma, siendo mas frecuentes entre el 5º y el 6º mes. Las vacas que abortan no muestran signos generales de enfermedad y puede ocurrir la repetición de abortos en una misma vaca **(85, 86)**. Se considera que *N. caninum* puede ocasionar pérdidas tempranas de preñez antes del 3^{er} mes de gestación, aunque es difícil de diagnosticar debido a que los fetos muertos, de 1 a 2 meses de gestación, son reabsorbidos, y solo se evidencia por la repetición del celo **(78)**.

Las vacas seropositivas a *N. caninum* tienen un mayor riesgo de abortar que las seronegativas; además son eliminadas anticipadamente debido a un bajo desempeño reproductivo **(87-90)**. También las vacas seropositivas necesitan más dosis inseminantes para quedar preñadas que las seronegativas **(91)**.

Existen unos pocos reportes en los que se mencionan las posibles pérdidas subclínicas en animales infectados, sobre todo en cuanto a la ganancia de peso **(92, 93)**.

Epidemiología y signología

En las explotaciones bovinas, los abortos pueden presentarse en forma esporádica, lo cual es frecuente en rodeos con infección endémica y vinculado a la TTendógena; o en forma epidémica (tormenta de abortos) por lo general en rodeos primoinfectados, y

asociado a una infección horizontal de las vacas y una consecuente TTexógena **(71, 94)**. La TT endógena, con nacimiento de terneros infectados sanos y abortos esporádicos serían la presentación más frecuente de la infección en los bovinos de varios países **(71, 95)**. En nuestro país se detectó la transmisión transplacentaria en bovinos de carne y de tambo **(81, 96)** pero se desconoce su prevalencia, así mismo la importancia relativa de la transmisión horizontal.

Los fetos pueden morir en el útero, ser reabsorbidos, momificados, o expulsados con un alto grado de autólisis. También se han informado nacimientos de prematuros con bajo peso, signos neurológicos que van desde ataxia leve hasta tetraparesis antes de los 2 meses de edad y muerte perinatal **(78)**. Los terneros pueden estar débiles, con los miembros flexionados o hiperextendidos o pueden presentar deformaciones. Los reflejos pueden estar presentes, disminuidos o ausentes. En algunos casos se observó exoftalmia o asimetría de los ojos. Por lo general, la temperatura, el ritmo cardíaco y respiratorio son normales **(97-99)**.

Es necesario realizar trabajos que permitan identificar la vía de infección más frecuente en nuestro medio y en consecuencia idear estrategias de control pertinentes.

Lesiones

En general los fetos o terneros natimortos no presentan lesiones macroscópicas típicas asociadas a una infección por *N. caninum*. Ocasionalmente se han observado focos pálidos en la musculatura esquelética y el corazón. Histopatológicamente se han observado cambios degenerativos e inflamatorios en varios tejidos, sobre todo en SNC, corazón, musculatura esquelética e hígado y ocasionalmente en pulmones y riñones

(56). Como lesión característica en el SNC se describe una encefalitis multifocal no supurativa, a veces acompañada por focos de necrosis y proliferación glial. Es frecuente la presencia de infiltración leucocítica multifocal no supurativa de las meninges. Las lesiones en el miocardio son importantes pero frecuentemente están enmascaradas por la autólisis **(1)**. Se ha observado necrosis de las vellosidades cotiledonarias en placentas abortadas, pero los protozoos se observan raramente en esas lesiones.

Pérdidas en producción

Algunos trabajos señalan importantes mermas en la producción lechera y de carne ocasionadas por la neosporosis, principalmente derivadas de los abortos **(83, 85, 100)**. En Argentina, los primeros hallazgos sobre la neosporosis fueron realizados en 1994 en la Cátedra de Parasitología y el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata , detectando anticuerpos anti-neospora, por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, en vacas con antecedentes de abortos y sin evidencias de otras enfermedades abortivas **(101)**. Actualmente la neosporosis es causal de abortos tanto en rodeos de tambo como de cría de nuestro país **(84)**. Aproximadamente un 7,3 % de los abortos en bovinos de Argentina se atribuyen a *N. caninum*, ocasionando pérdidas globales, causadas por la pérdida de terneros y lactancias, gastos de reposición y servicios veterinarios, estimadas en unos U\$s 80 millones **(102)**. Se ha comprobado la asociación de la neosporosis con la merma en la ganancia de peso **(92, 93)**. Los únicos datos disponibles sobre lo que ocurre en las condiciones de explotación de nuestro país, es

una prueba preliminar llevada a cabo por Venturini y col., en un feedlot, en la cual se detectó una diferencia significativa de 126 Kg. entre dos lotes de 6 animales (seropositivo y seronegativo), a favor del seronegativo **(103)**. Un estudio de Thurmond y Hietala en California describió una menor producción láctea en las vaquillonas de primera parición seropositivas a *N. caninum* con respecto a las seronegativas **(104)**. La menor producción láctea asociada a la mayor incidencia de abortos en las vacas seropositivas aumentaría el riesgo de descarte prematuro de las mismas **(90)**.

Diagnóstico

La metodología utilizada para el diagnóstico de la infección en animales aparentemente sanos y en los abortos se basa en la combinación de técnicas directas e indirectas.

Diagnóstico parasitológico:

El aislamiento en animales de laboratorio y/o en cultivos celulares es un posible método diagnóstico, aunque no de rutina; si bien, es poco eficaz, demostrado por los contados aislamientos a nivel mundial y solo 1 en Argentina, denominándose a la cepa NC 6 Argentina **(3, 105)**.

El examen histopatológico de tejidos fetales permite la detección de lesiones típicas. El hallazgo de quistes o taquizoitos, en tejidos teñidos con H&E, es difícil, siendo la técnica de Inmunohistoquímica (IHQ) la que permite una detección específica. De hecho, la confirmación de la etiología de los abortos se basa en la presencia de *N. caninum*, asociada a lesiones en tejidos, evidenciada mediante la IHQ **(105, 106)**. Los órganos de elección para el diagnóstico son cerebro, corazón e hígado **(78, 106)**.

Diagnóstico serológico

Los anticuerpos tanto IgM como IgG, aparecen en la primer semana posinfección, la IgM alcanza un máximo a las 2 semanas y la IgG sigue incrementándose hasta los 3-6 meses posinfección **(48, 107-109)**. Los fetos menores de 5 meses no son capaces de generar una respuesta inmune detectable, son negativos al examen serológico, aún los abortados por *N. caninum*. Además la detección de anticuerpos, tanto en el feto como en la madre, solo indica un contacto con neospora, pero no confirma el diagnóstico del aborto. La presencia de anticuerpos en los sueros de fetos y de terneros precalostro, evidencia la transmisión transplacentaria **(105)**. Luego del calostrado se detectan anticuerpos circulantes a los pocos minutos, y pueden perdurar algunos meses debido a que tienen una vida media de 20 días aproximadamente **(110, 111)**.

Los métodos serológicos mas difundidos actualmente son diversas pruebas de ELISA, IFI, la aglutinación directa con antígeno formulado y recientemente el Western Blot **(105, 112-116)**. La técnica de IFI, con la cepa NC1 como antígeno, fue la primera prueba inmunoserológica usada para la detección de anticuerpos anti- *N. caninum* y se la utiliza como prueba de referencia para el desarrollo de otras técnicas **(105, 112)**. A pesar de esto no existe hoy en día un consenso en cuanto a los títulos de corte a aplicar, siendo necesario definirlos para cada situación en particular **(105, 117, 118)**. Hasta el momento se sabe poco de la variación de títulos en el tiempo, sobre todo en terneros, por lo que el trazado de un perfil serológico nos permitiría evaluar estas variaciones y detectar las vías de infección más importantes en nuestro medio.

Diagnóstico molecular

La técnica de PCR, es en muchos casos un complemento indispensable a la hora de confirmar la presencia de *N. caninum* en tejidos de fetos abortados y de animales adultos, debido a la baja eficacia del aislamiento y a que la serología negativa no es confirmatoria **(105, 119)**. También se ha utilizado esta técnica para identificar el ADN de *N. caninum* en muestras de líquido amniótico, sangre, leche, semen y en ooquistes de heces de perros y coyotes **(3, 63, 74, 105, 119)**. En general se recomienda tener precauciones durante la toma de muestras para evitar contaminaciones con *N. caninum*, y preservarlas congeladas a -20°C. Es factible realizar la prueba con tejidos fijados en formol y montados en parafina **(120)**. Existen diversos protocolos de PCR, pero el que usa el gen repetitivo pNc 5 como “target”, mediante los primers Np6 y Np21 es el más usado mundialmente **(105)**. La sensibilidad de esta prueba es variable y depende del tamaño de la muestra de tejido. En un estudio reciente se puso en evidencia que la sensibilidad y especificidad es variable entre laboratorios **(121)**. Basso y col en 2005 comenzaron a aplicar la técnica de PCR para diagnóstico en nuestro país en fetos abortados **(122)**.

3. Objetivos

- A. Trazar el perfil serológico de las infecciones por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum*, en una explotación seleccionada de cría de bovinos, desde el nacimiento hasta los 8 meses de edad.
- B. Comparar los perfiles serológicos de las infecciones por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum*.
- C. Determinar si las infecciones por *Sarcocystis cruzi* y/o *Neospora caninum* producen merma en la ganancia de peso.
- D. Evaluar la transmisión vertical y horizontal de *S. cruzi* y *N. caninum* y analizar el valor de los títulos por IFI como predictores de la frecuencia de transmisión vertical.
- E. Detectar abortos asociados a infecciones por *Sarcocystis cruzi*

Objetivos intermedios

- A. Poner a punto la técnica de Inmunofluorescencia indirecta para *Sarcocystis cruzi*
- B. Diagnosticar infecciones por *Sarcocystis* sp, mediante la técnica de IFI con antígeno de *S. cruzi*
- C. Detectar coinfecciones con *S. cruzi* y *N. caninum* en bovinos de carne.
- D. Poner a punto la técnica de PCR para *S. cruzi*

4. Hipótesis más relevantes

1. La transmisión horizontal predomina sobre la transplacentaria en las infecciones por *Sarcocystis cruzi*.
2. La transmisión transplacentaria predomina sobre la horizontal en las infecciones por *Neospora caninum*.
3. Los perfiles serológicos se corresponden con la forma de transmisión.
4. Las infecciones por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum* están asociadas con disminución de la ganancia de peso en terneros de cría de la República Argentina.
5. Los anticuerpos anti-*Sarcocystis* y/o ADN de *Sarcocystis cruzi* son detectables en fetos abortados.

Capítulo II:

Diagnóstico de infecciones por
Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum
en bovinos

Diagnóstico de infecciones por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum* en bovinos.

Introducción

Las infecciones por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum* en bovinos se hallan mundialmente distribuidas. De las especies de *Sarcocystis* que afectan bovinos, *S. cruzi* es la más prevalente, llegando en algunos países a ser detectado en más del 90% de los animales adultos **(2)**. Ocasionalmente *S. cruzi* puede causar signología sistémica, pérdida de estado y abortos**(2)**. Los reportes acerca de la infección por *Sarcocystis* en bovinos de Argentina son escasos y solo detectan la presencia de quistes musculares, sin identificar especies **(23, 24)**.

La neosporosis es reconocida como la causa más importante de abortos en bovinos en muchos países, incluida la Argentina **(81, 85)**.

Los métodos serológicos tales como el ELISA e IFI son útiles para la detección de anticuerpos anti *N. caninum* y *Sarcocystis* sp en infecciones simples y mixtas**(48, 49)**. El diagnóstico cualitativo y cuantitativo de *Sarcocystis* puede ser llevado a cabo mediante inspección microscópica, pero para el diagnóstico específico de *N. caninum* se requieren técnicas como la Inmunohistoquímica y PCR **(105, 119)**.

Materiales y métodos

Animales:

Se muestrearon un total de 90 animales en 2 frigoríficos de la provincia de Buenos Aires. El muestreo se realizó a razón de 5 animales por semana entre Junio y Diciembre

del 2004. Se muestrearon 30 novillos (24-30 meses de edad), 30 vaquillonas (14-16 meses) y 30 animales adultos: 20 vacas y 10 toros (42-112 meses de edad).

Muestras:

De cada animal se tomaron 15 ml de sangre, 50 gr de diafragma, 10 cm de esófago y 100 gr de miocardio (ventrículo izquierdo). Las muestras se transportaron refrigeradas en un bolso térmico y arribaron al laboratorio dentro de las 6 horas posteriores a la faena. Las muestras de sangre se centrifugaron para separar el coágulo y extraer el suero, que fue colocado en tubos Eppendorff a - 20°C hasta su procesamiento por técnicas serológicas.

Las muestras de diafragma, esófago y miocardio fueron submuestreadas de la siguiente manera: 1 gr se colocó en formol bufferado al 10% para estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos, 1 gr se colocó en tubos Eppendorff de 1,5 ml a -20°C para estudios moleculares y 1 gr se utilizó para el examen en fresco.

Técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta

Para la detección de anticuerpos anti *N. caninum* y anti *Sarcocystis* en el suero de los animales muestreados se procedió acorde a lo mencionado en el Anexo de técnicas diagnósticas. Los sueros se diluyeron en PBS a partir de 1/25 en base 2 hasta dilución final. Se usó como conjugado suero de conejo anti IgG bovina marcado con isotiocianato de fluoresceína. En cada rutina de IFI se colocaron sueros bovinos controles, positivos y negativos. Se consideró positiva aquella reacción en la que toda la superficie del merozoito resultara fluorescente a la observación microscópica. Los

títulos de IFI para *N. caninum* y *Sarcocystis* sp se compararon con el test de correlación.

Estudios microscópicos

Examen en fresco:

Las submuestras de esófago, diafragma y miocardio fueron colocadas en placas de Petri, disecadas con agujas, hidratadas con unas gotas de solución fisiológica y observadas con lupa estereoscópica para la detección de quistes de *Sarcocystis* sp; los observados en miocardio fueron contados. Las diferencias en cantidad de quistes entre categorías animales fueron evaluadas por el test de bondad de ajuste (Epi 6).

Se recuperaron 129 quistes de miocardio (50 quistes provenientes de 10 vaquillonas, 27 de 8 novillos y 52 de 12 bovinos adultos) mediante aspiración con tubo capilar, de los cuales se midieron el largo y el espesor de la pared. Las diferencias del largo de los quistes entre las diferentes categorías animales fueron evaluadas por ANOVA.

Histopatología e Inmunohistoquímica

Treinta muestras de miocardio de animales con gran cantidad de quistes por gramo o títulos ≥ 200 para el IFI con antígeno de *S. cruzi* fueron seleccionadas y montadas en parafina. Para los estudios histopatológicos se cortaron láminas de 5 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina en la Cátedra de Patología especial de la FCV-UNLP.

Para Inmunohistoquímica se seleccionaron 20 muestras de miocardio de animales seropositivos para *N. caninum* (Títulos de IFI 25 a 800). Se utilizó el Kit comercial LSAB + Sistem HRP (Dako Cytomation, Carpintería, USA) acorde a las instrucciones del

fabricante, utilizando como anticuerpo primario suero anti *N. caninum* producido en conejo (Ver Anexo técnicas empleadas).

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se tomaron 25-50 mg de miocardio para estudios moleculares, de los mismos 20 animales seleccionados para IHQ. La extracción de ADN se llevó a cabo con un kit comercial (DNeasy® Tissue Kit, QIAGEN, Hilden, Germany), acorde a las instrucciones de los fabricantes. La amplificación se llevó a cabo con los primers específicos de *N. caninum* Np6 y Np21 **(123-125)** según las instrucciones expuestas en el Anexo de técnicas empleadas. En cada ciclo de amplificación se usó ADN de taquizoitos de la cepa NC 1 como control positivo y mastermix más agua como control negativo. Los amplificados se pusieron en evidencia mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y tinción con nitrato de Plata**(126)**.

Resultados

Estudios microscópicos

Examen en fresco:

Se hallaron quistes de *Sarcocystis* en el 100% de las muestras de miocardio, en 71 % de los esófagos y en 28 % de las muestras de diafragma. Todos los quistes fueron identificados como de la especie *S. cruzi* a criterios morfológicos: presentaron pared fina (< 1 µm) y vellosidades de 6 a 13 µm de largo en la superficie del quiste **(Foto 1, pag. 98)**. No se observaron quistes de pared gruesa con estriaciones radiadas (*S. hominis* y *S. hirsuta*) que miden entre 2,5 y 9 µm. El rango de medida de los quistes fue

de 153 a 782 μm de largo. El largo promedio de los quistes fue 301 μm para las vaquillonas, 387 μm para los novillos y 442 μm para los adultos, mediante ANOVA las diferencias en tamaño fueron significativas ($p < 0.01$). La cantidad de quistes por gramo de miocardio varió de 8 a 380. El gráfico 1 muestra la distribución de quistes por gramo de miocardio en las diferentes categorías animales.

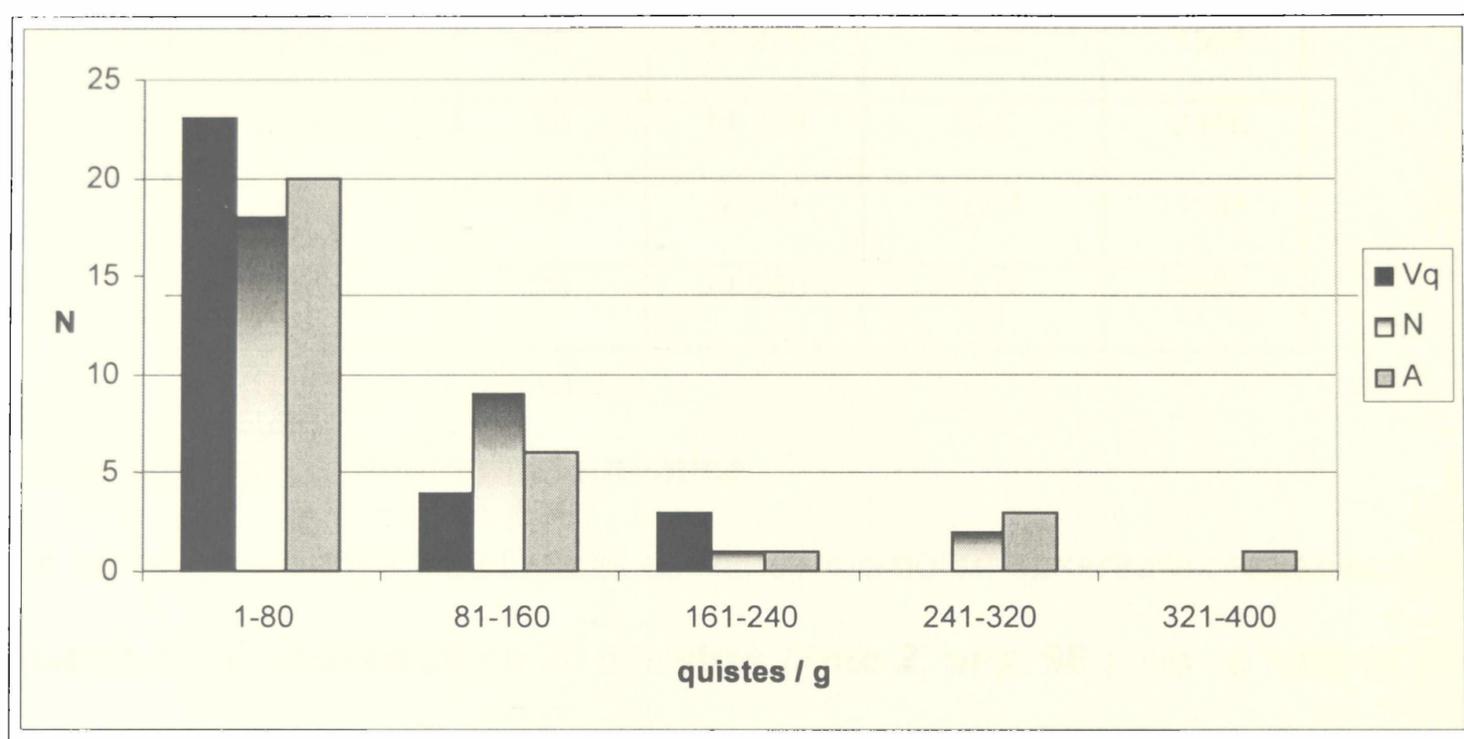


Gráfico 1: Distribución de los quistes por gramo en cada categoría animal.

Ref. Vq: Vaquillonas; N: Novillos; A: Adultos (Vacas y toros).

La tabla 1 muestra el promedio y el número total de quistes para cada categoría.

Las diferencias entre la proporción de quistes totales fueron significativas entre terneras y vacas ($p < 0.001$), entre novillos y toros ($p < 0.001$), y entre machos y hembras ($p < 0.001$).

Tabla 1: Cantidad de quistes(Q)de *Sarcocystis* por gramo de miocardio en cada categoría animal.

Categorías	N	Q rango	Q promedio	Q Total
Vaquillonas	30	10-228	62,2	1866
Novillos	30	14-188	81,6	2448
Toros	10	8-380	113,4	1134
Vacas	20	24-290	77,5	1550

N: número de animales

Histopatología e Inmunohistoquímica

En las preparaciones histológicas de miocardio no se observaron lesiones y se hallaron quistes de *S. cruzi* en 28 de 30 muestras (**Foto 2, pag. 98**). No se halló *N. caninum* en los 30 cortes teñidos con H&E ni en los 20 cortes procesados por medio de inmunohistoquímica para *N. caninum*.

Inmunofluorescencia indirecta

Se detectaron anticuerpos contra el antígeno de *S. cruzi* en el 100% de las muestras y para *N. caninum* en 73% de las muestras de suero (Título de IFI ≥ 25). En el gráfico 2 se muestra la distribución de títulos de IFI para ambos antígenos. No se encontraron valores de correlación significativos entre los títulos para *N. caninum* y *Sarcocystis* ($r = 0.15$).

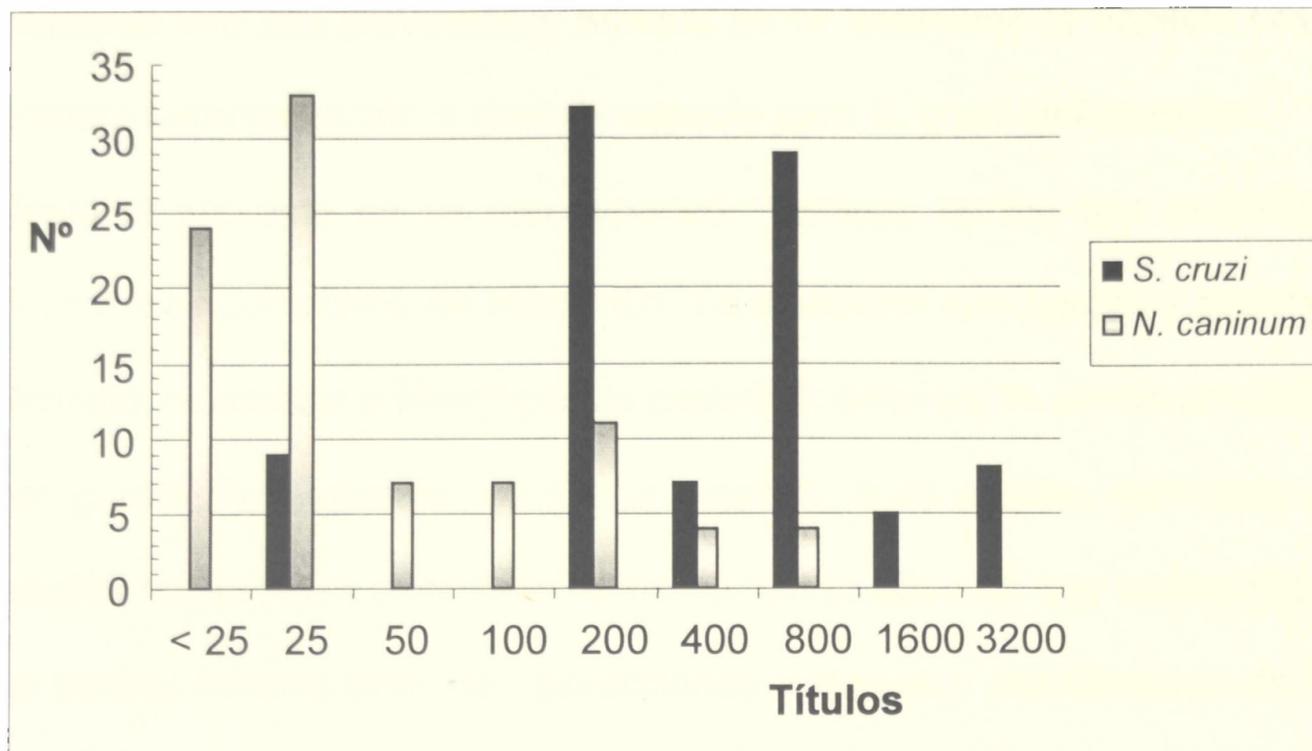


Gráfico. 2: Comparación de títulos de IFI para *S. cruzi* y *N. caninum*.
Ref: Nº: número de animales.

Además se detectaron 16 vaquillonas, 25 novillos y 25 animales adultos seropositivos para ambas serologías, el resto de los animales de cada categoría resultaron positivos solo a la IFI con antígeno de *S. cruzi*.

PCR

En las electroforesis de los amplificados no se observó la banda específica de *N. caninum*, de 328 pb en ninguna de las 20 muestras procesadas.

Discusión

Todos los quistes detectados correspondieron morfológicamente a *S. cruzi* **(2)**. La frecuencia de detección fue alta entre 28 y 100 % en los diferentes tejidos, estos hallazgos concuerdan con reportes de sarcocystosis por *S. cruzi* de otros países, siendo miocardio el órgano más afectado **(2)**. Los reportes previos en Argentina también

indicaron una alta prevalencia, aunque no se determinó la especie **(23, 24)**. Esta es la primera caracterización a nivel de especie para *S. cruzi* en Argentina.

Hasta el presente no se han reportado trabajos en los que cuantifiquen quistes de *Sarcocystis* por gramo de miocardio. La disección con agujas y observación en fresco permitió, cuantificar e identificar las especies, detectando un rango entre 8 y 380 quistes por gramo de miocardio. La mayor proporción de quistes detectada en los animales adultos sugiere que el número aumenta con la edad, lo que podría estar dado por falta de control inmune ante las reinfecciones y mayores posibilidades de los adultos para tomar contacto con esporocistos. Los machos presentaron una mayor proporción de quistes que las hembras. Savini y col en 1992, detectaron una mayor prevalencia en toros que en vacas, ellos sugieren que los toros pastorean y son alimentados en potreros cercanos a los edificios de las granjas donde el contacto interespecífico y el riesgo de infección son mayores **(22)**. En Argentina se aplican similares prácticas de manejo, lo que podría estar relacionado con la mayor cantidad de quistes en machos, aunque no se pueden descartar diferencias en la respuesta inmune entre sexos.

El tamaño de los quistes también fue mayor en los animales adultos, lo que indica un crecimiento de los quistes continuo en el tiempo. La cuantificación y la medición de quistes y su comparación entre los diferentes sexos y categorías animales suministraron nueva información en la dinámica de la infección por *S. cruzi*.

En fetos bovinos es factible detectar *N. caninum* en miocardio mediante IHQ y PCR **(105)** y existe un reporte que indica su detección por PCR en corazón en 1 de 6 vacas infectadas experimentalmente**(127)**. Sin embargo *N. caninum* no fue detectado en las

muestras de miocardio por IHQ ni por PCR de 20 animales seropositivos, quizás debido a que el protozoo no está presente en miocardio o en la porción examinada.

La inmunofluorescencia indirecta con antígeno de *S. cruzi* reveló la presencia de anticuerpos en todos los animales, con título de Ig G entre 25 y 3200. Confirmado por los hallazgos parasitológicos el título 25 sería indicador de infección. Este es el primer reporte serológico para *Sarcocystis* sp en bovinos de Argentina.

La falta de correlación significativa entre los títulos de IFI para *N. caninum* y *Sarcocystis* sp, sugiere que los títulos de Ig G ≥ 25 son específicos y que aquellos animales con serologías positivas para ambas infecciones estarían coinfectados. Dubey y col. en 1996 tampoco detectaron reacción cruzada mediante IFI con antígenos de *N. caninum*, *S. cruzi* y *T. gondii* y sueros de animales infectados experimentalmente con los tres protozoos (48).

Se encontraron un 73,4% de animales positivos a ambas serologías y un 26,6% solo positivas al antígeno de *S. cruzi*. Se necesitan más estudios para determinar si esta alta proporción de animales coinfectados también se manifiesta en la población bovina Argentina y si estas coinfecciones tienen implicancias en la producción de carne. En conclusión la serología mediante IFI es un método adecuado para diagnosticar las infecciones por *S. cruzi* y *N. caninum* en bovinos, debido a la detección específica de Ig G, además la IFI es una herramienta útil para evaluar el impacto de estas infecciones en la producción bovina. Las técnicas de IHQ y PCR serían métodos menos apropiados para detectar *N. caninum* en miocardio de bovinos adultos.

Capítulo III

Transmisión transplacentaria y horizontal de *S. cruzi* y *N. caninum* en bovinos evaluadas mediante Inmunofluorescencia indirecta

Transmisión transplacentaria y horizontal de *S. cruzi* y *N. caninum* en bovinos evaluadas mediante Inmunofluorescencia indirecta.

Introducción

Las infecciones de los bovinos por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum* tienen amplia distribución mundial. En la provincia de Buenos Aires, al igual que en otras regiones del mundo, la prevalencia de *S. cruzi* fue del 100% **(2, 128)** y la seroprevalencia de *N. caninum*, utilizando Inmunofluorescencia indirecta, fue de 73% **(128)** y del 82,2 % **(Venturini L, datos sin publicar).**

S. cruzi y *N. caninum* se puede transmitir en forma horizontal cuando los bovinos ingieren esporocistos u ooquistes eliminados por los hospedadores definitivos **(2, 3, 65)** y/o en forma vertical, por la vía transplacentaria.

La infección por *S. cruzi* por la vía transplacentaria se ha comprobado en casos experimentales y esporádicamente en infecciones naturales **(31-33, 129)**; aunque se considera que ocurre raramente, en la bibliografía consultada no se hallaron estimaciones de la frecuencia.

La vía transplacentaria ha sido considerada por muchos autores la forma mas importante de transmisión de *N. caninum* y para algunos, la única **(69, 95, 130)**.

Aunque se han aplicado distintas metodologías para evaluar la transmisión por ambas vías **(105)**, se consideró que la detección de anticuerpos precalostrales en terneros, proporciona una valiosa evidencia de la transmisión vertical. En los bovinos los anticuerpos maternos no atraviesan la placenta, los únicos anticuerpos presentes en

el suero de fetos abortados y de terneros que no han bebido calostro, son los generados durante la vida intrauterina frente a una infección. Se comprobó que la detección de anticuerpos para *N. caninum*, por el método de IFI a la dilución 1/25 en fluidos fetales, confirma la infección del feto por este protozoario **(131)**.

Después de calculada la frecuencia de la transmisión transplacentaria como la proporción de terneros seropositivos que nacen de madres seropositivas, se puede estimar el valor de la transmisión horizontal por la diferencia entre la seroprevalencia en los terneros precalostro y la seroprevalencia en las vacas. Se pueden obtener mas datos sobre la transmisión horizontal, si es posible examinar nuevamente animales precalostro negativos después de la desaparición de los anticuerpos calostrales **(105, 111, 132)**. Para tomar medidas para la prevención y/o control de estas infecciones es necesario determinar que forma de transmisión predomina **(71)**.

Materiales y Métodos

Muestras

Se trabajó en un establecimiento lechero de la localidad de 30 de Agosto, partido de Trenque Lauquen, provincia de Buenos Aires (E1). Tenía 714 vacas cruce Holstein - Jersey en ordeño, una tasa anual de abortos del 4% y 1 diagnóstico de aborto por neosporosis. En el establecimiento había 4 perros. La fauna silvestre presente es la correspondiente a la Pampa húmeda, siendo los zorros parte de la misma.

Se tomaron muestras de sangre de 173 vacas y sus respectivos terneros(N=173; 97 machos y 76 hembras); 66 (34 machos y 32 hembras) en febrero - marzo de 2006 y 107 (63 machos y 44 hembras) en febrero de 2007. La extracción se hizo por punción de la vena yugular, en el momento del parto, antes que mamaran calostro (**Foto 5, pag. 100**). En todos los casos se identificaron los pares madre-hijos a medida que se producían los nacimientos. Además se sangraron 12 de los terneros/as a las 24 hs de mamado el calostro y 25 terneras a los 7 meses del nacimiento.

Las muestras de sangre de las madres respectivas se tomaron durante el ordeño del calostro (a las 24-48 hs del parto), por punción de la vena coccígea. Las 173 vacas que constituyeron el lote de estudio fueron de primera a décima parición. De 81 vacas multiparas de este lote se obtuvieron también muestras de sangre al servicio.

Todas las muestras se centrifugaron en el establecimiento, los sueros se pusieron en tubos de 1,5 ml y se transportaron al laboratorio a – 20°C.

Inmunofluorescencia indirecta

Para la detección de anticuerpos para *N. caninum* y para *Sarcocystis* sp en el suero de los animales muestreados, se procedió acorde a lo descrito en el Anexo de técnicas diagnósticas. Los sueros se diluyeron en PBS en base 2, desde 1/25 hasta dilución final. Las muestras de los pares madre - hijo se procesaron el mismo día. Se consideraron seropositivos todos los animales con título \geq a 25.

La transmisión transplacentaria se estimó como la proporción de terneros seropositivos que nacieron de vacas seropositivas (terneros seropositivos /vacas seropositivas x 100).

La transmisión horizontal se estimó de dos formas: por la diferencia de seroprevalencias entre las vacas y los terneros precalostro y por la proporción de terneras que se positivizó entre el muestreo precalostro y el realizado a los 7 meses.

Se evaluaron las diferencias en frecuencia de transmisión vertical de *N. caninum* entre vacas con títulos bajos (>25 a < 400) y vacas con títulos altos (≥ 400). Además se compararon los porcentajes de terneros con títulos altos, nacidos de madres con títulos altos y bajos por el Método de la comparación de proporciones en muestras independientes. Se calculó el intervalo (IC) para los porcentajes con 95% de confianza (Epidat, versión 3.1).

Resultados

Se detectaron anticuerpos para *S. cruzi* en los sueros de todas las vacas examinadas y en los de 3 terneros antes de ingerir calostro. La transmisión transplacentaria fue de 1,7% (3/173; IC 0,3-4,9%). De los 3 sueros precalostro positivos a *S. cruzi* uno también fue positivo para *N. caninum*, los títulos de IFI para *Sarcocystis* de las madres de estos terneros fueron de 50 a 200.

Se detectaron anticuerpos para *S. cruzi* en todos los sueros pos-calostro, en 9 de 12 el título fue de 2 a 8 veces mayor que el de la madre, en 1 fue 16 veces mayor y en 2 fue la mitad. En las 25 terneras examinadas a los 7 meses, se detectaron títulos ≥ 50 . Los títulos promedio para *S. cruzi* al servicio y al parto fueron respectivamente 134,2 y 108,2.

La seroprevalencia de *N. caninum* en las vacas fue de 80,9 % (140/173; IC 74,8-87,6) y en terneros antes de beber calostro fue de 30% (52/173; IC 22,9-37,1). La Tabla 2 muestra la distribución de madres e hijos según al título de IFI para *N. caninum*.

Tabla 2: Frecuencia de título de IFI para *N. caninum* de madres y terneros.

Vacas	Terneros												tp	N
	<25	25	50	100	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600		
<25	32	1											1	33
25	41	1		3			1			1			6	47
50	29			1		1	1						3	32
100	11			1									1	12
200	5	2			1			2					5	10
400								1	1	2	3		7	7
800	2			2		1		2	2	4	2	4	17	19
1600							1		1	3	2	1	8	8
3200									1	1	1	2	5	5
total	120	4		7	1	2	3	5	5	11	8	7	53	173

tp= terneros positivos. N : cantidad de pares madre-hijo.

La transmisión transplacentaria fue de 37,1 % (52/140; IC 28,7- 45,5); el porcentaje de transmisión en vacas con títulos altos fue de 94,8 % (37/39; IC 82,6-99,3), significativamente más alto que en vacas con títulos bajos, en las cuales fue de 14.8 %

(15/101; IC 7,4 - 22,2). Para el total de vacas <400 la transmisión transplacentaria fue 11,4% (16/140; IC 5,8 – 17).

Un 94,5% (35/37; IC 81,8-99,3) de los terneros hijos de vacas con títulos altos y un 40 % (6/15; IC 16,3- 67,7) de los nacidos de vacas con títulos bajos, tuvieron títulos ≥ 400 , esta diferencia de proporciones fue significativa ($p < 0.001$).

En la Tabla 3 se hallan los resultados de la serología al servicio y al parto del lote de las 81 vacas, agrupados por título. El título promedio al servicio fue 120,6 y 320,9 al parto.

Tabla 3: Título de IFI para *N. caninum* de 81 vacas al servicio y al parto.

Servicio	Parto			Total
	<25	$\geq 25 < 400$	≥ 400	
<25	15	12		27
$\geq 25 < 400$	2	34	6	42
≥ 400			12	12
Total	17	44	18	81

El 100% de 12 vacas (IC 73,5-100,0) ≥ 400 al servicio, estuvo dentro del mismo rango de títulos al parto. Representaron el 66% (12/18; IC 40,9-86,6) de la población de vacas de ese lote que tuvo título ≥ 400 al parto.

En la tabla 4 se hallan los resultados de la detección de anticuerpos para *N. caninum* en las muestras de los terneros precalostro, poscalostro y de sus madres.

Tabla 4: Comparación de los títulos de IFI para *N. caninum* de las vacas y sus terneros pre y poscalostro

	Nº	1	1	2	1	2	2	1	1	1
Vacas		0	0	25	25	50	50	800	800	1600
Terneros	prec	0	0	0	0	0	0	3200	6400	3200
	posc	0	50	50	200	100	200	6400	3200	6400

Nº: cantidad de pares madres e hijos con la serología correspondiente. prec: precalostro;

posc: poscalostro ,0: título<25.

La evolución de los títulos de las 25 terneras que se sangraron precalostro y a los 7 meses de vida fue como sigue: de 6 terneras positivas, 5 permanecieron positivas con títulos ≥ 100 ; de las 19 negativas precalostro, 9 tuvieron títulos de 25 y 50.

Discusión:

La seroprevalencia para *S. cruzi* fue de 100% en vacas adultas, igual que la informada en otros trabajos **(2, 128)**.

El porcentaje de transmisión transplacentaria de 1,73%, confirma que la transmisión vertical tiene escasa participación en los altos niveles de prevalencia de *S. cruzi* en la población bovina **(31-33, 129)**. Considerando que la vida media de los anticuerpos calostrales es de 20 días **(110, 111)** los anticuerpos detectados en las 25 terneras examinadas a los 7 meses no tendrían ese origen, sino que provendrían de la respuesta a una infección que ocurrió muy tempranamente en la vida de los bovinos por una gran disponibilidad de esporocistos en el medio ambiente.

La seroprevalencia de *N. caninum* en estas vacas fue de 81% ; se ha señalado que las estimaciones de la seroprevalencia pueden tener diferencias entre países, dentro de un mismo país y entre tipos de ganado **(71)**, la estimación de este estudio fue algo superior a la del 73 % del ganado de faena **(128)** pero es similar al 82,2 % (474/576) que se había estimado en explotaciones lecheras de características similares a las de este trabajo, en las cuales se utilizó el mismo método serológico y título de corte **(Venturini L, datos sin publicar)**.

La transmisión transplacentaria de *N. caninum* fue de 37,1 %; pero estuvo asociada al título de las vacas, fue del 94,8 % en vacas con título ≥ 400 y de 14,8 % en vacas con títulos entre ≥ 25 a < 400 . Los valores estimados por Pare y col en 1996 y Davison y col en 1999, de 81% y 95,2% respectivamente **(95, 130)** utilizando un test de ELISA fueron similares a los obtenidos en este trabajo en las vacas con títulos ≥ 400 . Según el estudio de Pare y col en 1996, 8 de 170 (5%) vacas seronegativas parieron terneros seropositivos **(95)**. En el presente estudio de 33 vacas seronegativas nació 1 ternero positivo (3%); por otro lado, si se hubiera usado ≥ 400 como título de corte para este estudio habrían sido 6 de 101 (5,9 %) los terneros positivos de madres negativas y 11 no habrían sido detectados. Posiblemente, los test de ELISA utilizados por los autores antes mencionados hallan sido desarrollados para el diagnóstico de abortos **(105)**, y fueran menos sensibles que la técnica de IFI aplicada como en este trabajo.

Ya se había establecido que los títulos altos detectados al parto **(133)** o durante la preñez **(134)** estaban relacionados con la transmisión vertical. En este estudio, las 12 vacas que tuvieron título ≥ 400 al servicio, mantuvieron el mismo rango de títulos al parto. Por lo tanto los títulos de las vacas al servicio y a la parición, podrían ser

utilizados como predictores de transmisión vertical dentro de los límites de confianza establecidos y en explotaciones con características similares.

El aumento de los niveles de anticuerpos durante la preñez ha sido relacionado con reactivaciones de infecciones crónicas, lo que podría resultar en transmisión vertical **(105)**. En este estudio los títulos de IFI para *N. caninum* aumentaron entre el servicio y el parto como se evidencia en el incremento del promedio de títulos.

A diferencia de lo que ocurrió con los títulos para *N. caninum*, el valor promedio de los títulos de IFI con antígeno de *S. cruzi*, no tuvo variación entre el servicio y el parto, esto podría deberse a una escasa o nula reactivación de la infección y relacionarse al bajo nivel de transmisión vertical por *S. cruzi*.

Un 17% (9/53) de los terneros que nacieron infectados con *N. caninum*, fueron hijos de vacas con títulos 25 y 50, y 1 de una vaca < 25, lo que indica que aunque los títulos sean bajos, en algunos animales, la infección puede estar activa y transmitirse. Esto debe ser tenido en cuenta cuando el método de IFI se utiliza con fines diagnósticos, en planes de control y/o prevención, como así también para seleccionar animales libres de infección **(71, 105)**.

La seroprevalencia de *N. caninum* en los terneros precalostro fue de 30%; así, la prevalencia en adultos tendría esta proporción aportada por la transmisión vertical y la diferencia hasta llegar al 81% sería alcanzada por la transmisión horizontal. La seroprevalencia de 47,3% (9/19), a los 7 meses, en el lote de terneras negativas en la muestra precalostro, también indicaría un valor similar de transmisión horizontal. Estos valores difieren de los que obtuvieron otros autores, de 4,5 % **(132)**, 22 % **(135)** y 1,9 % **(130)**, utilizando la técnica de ELISA. Estas diferencias podrían deberse a los métodos

serológicos utilizados y/o a condiciones de manejo particulares, que podrían aumentar las probabilidades de que los bovinos ingieran ooquistes. De cualquier modo, es importante destacar que para aplicar estrategias de control y prevención es imprescindible evaluar ambas vías de infección **(71)**.

Los terneros infectados transplacentariamente tuvieron, en promedio, títulos precalostro casi 20 veces mayores que los de las vacas, por otro lado los títulos poscalostro para *N. caninum*, en terneros no infectados hijos de madres positivas, fueron 2 a 8 veces superiores al de sus madres. Estos datos podrían evidenciar un mayor nivel de títulos en los infectados transplacentariamente, pero sin embargo los datos no son suficientes como para estimar el título de corte que permita distinguir entre los terneros infectados de los no infectados pero con títulos calostrales.

En conclusión, este es el primer trabajo de serología en terneros precalostro en Argentina. Se determinó una frecuencia de transmisión transplacentaria de 37,1 % y una frecuencia de transmisión horizontal próxima al 50% para *N. caninum*; además una transplacentaria de 1,73 % y una horizontal del 98 % para *S. cruzi*.

Capítulo IV

Perfiles serológicos para las infecciones naturales por *S. cruzi* y *N. caninum* en terneros de cría.

Perfiles serológicos para las infecciones naturales por *S. cruzi* y *N. caninum* en terneros de cría.

Introducción

Las infecciones por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum* pueden ocasionar pérdidas en la producción bovina en la mayoría de los países, principalmente abortos por neosporosis y ocasionalmente enfermedad sistémica y muerte de animales por sarcocystosis **(2, 5, 81, 85)**.

Existen reportes que evidencian pérdidas en la ganancia de peso, ocasionadas por *N. caninum*, asociadas al *status* serológico de los animales **(136, 137)**, en nuestro país también se detectaron estas pérdidas en un muestreo preliminar en animales de feedlot **(103)**.

La sarcocystosis puede ocasionar disminución de la ganancia de peso, aunque esto solo se ha evidenciado en infecciones experimentales **(37)**. Se desconoce si estas pérdidas ocurren en infecciones naturales.

Para el diagnóstico de neosporosis y sarcocystosis en animales *in vivo* se utilizan diversas técnicas serológicas, siendo IFI y ELISA las más usadas **(43, 47, 105)**. Existen escasos reportes que detecten la evolución de los anticuerpos en el tiempo y menos aún que la asocien a pérdidas en la ganancia de peso en terneros infectados naturalmente con *N. caninum* o *S. cruzi* **(136-138)**. La evaluación del *status* serológico en correspondencia con la edad de los animales, como así también la comparación de serologías de madres e hijos y la serología precalostro, pueden ayudar también a

determinar la vía de infección más frecuente en el rodeo (**83, 105, 111, 130, 139**) . Para diferenciar entre infecciones recientes y crónicas por *N. caninum*, se pueden utilizar ELISAs de avidez de Ig G (**135**).

Materiales y métodos

Muestras

Se trabajó en dos establecimientos de cría E2 y E3. En E2: “El Desafío” , ubicado en el Cuartel XII, partido de Las Flores, provincia de Buenos Aires, se tomaron muestras de sangre y se pesaron 43 terneros (21 machos y 22 hembras) en tres oportunidades, entre julio y octubre de 2005. La edad inicial de los terneros varió entre 15 y 120 días. En julio también se muestrearon las madres (**Foto 6, pag. 100**).

En E3 “Los Verdes”, ubicado en el Cuartel III, del partido de Las Flores, provincia de Buenos Aires, se muestrearon 69 terneros, 29 hembras y 40 machos. Se sangraron y pesaron simultáneamente, con intervalos de aproximadamente 30 días, desde noviembre de 2005 hasta abril de 2006. La edad inicial fue de 15 a 60 días.

En ambos muestreos los animales permanecieron encerrados de 12 a 18 horas antes de cada toma de muestras. Se sangraron por punción de la vena coccígea, las muestras de sangre se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio (dentro de las 24hs de tomadas en el campo) en donde se centrifugaron y los sueros se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

Todos los animales recibieron oportunamente las vacunas y los tratamientos antiparasitarios de rutina.

Inmunofluorescencia indirecta para *N. caninum* y *S. cruzi*

Para la detección de anticuerpos anti *N. caninum* y anti *Sarcocystis* sp en el suero de los animales muestreados se procedió de acuerdo a los métodos descritos en el Anexo de técnicas diagnósticas empleadas.

La inmunofluorescencia se hizo después de finalizar todos los muestreos, en cada establecimiento, de manera de procesar todas las muestras de cada animal en la misma rutina, junto a los sueros controles.

Se promediaron los valores de títulos obtenidos en cada uno de los muestreos para trazar los perfiles serológicos de ambas infecciones.

Para evaluar las diferencias en ganancia de peso se confeccionaron lotes acorde a los títulos de anticuerpos para cada serología:

Para el caso de *S. cruzi*, se diferenciaron dos grupos de animales uno con títulos de IFI mayores a 200 en los últimos muestreos y el otro con títulos de 200 o menores en todos los muestreos.

Para *N. caninum* se estimó que los anticuerpos detectados después de los 150 días de vida, indican infección, ya sea transplacentaria u horizontal. De acuerdo a los resultados de las serologías, transcurridos los 3 o 6 muestreos, se clasificaron los animales de la siguiente manera:

Para E2 se clasificaron en **no infectados**: los que fueron siempre negativos, **infectados**: los que fueron positivos a los 150 o más días de edad y **dudosos** los que fueron positivos teniendo menos de 150 días.

Para E3 se los clasificó como **no infectados**: a los siempre negativos y los negativos desde los 150 días; como **infectados por vía transplacentaria**: a los que fueron siempre positivos; **infectados por vía horizontal**: a los positivos desde los 150 o mas días de edad; y sin determinar la vía de infección a los positivos que no se ajustaron a estos parámetros.

Para determinar si hubo diferencias significativas en la ganancia diaria de peso (GDP) entre los diferentes grupos animales se utilizó ANOVA.

Resultados

E2: Las tablas 5 y 6 muestran la frecuencia de títulos para *Sarcocystis* sp y *N. caninum*, respectivamente, en cada muestreo.

Tabla 5: Distribución de los títulos de anticuerpos anti- *Sarcocystis* sp en E2.

M	Títulos						
	<25	25	50	100	200	400	800
1	6	19	6	9	2	0	0
2	1	5	13	11	8	2	2
3	0	3	14	10	15	8	2

M: muestreos

Tabla 6: Distribución de los títulos de anticuerpos anti- *N. caninum* en E2.

M	Títulos						
	<25	25	50	100	200	400	800
1	33	6	0	2	0	0	1
2	24	13	1	3	0	0	1
3	22	13	3	3	0	1	0

M: muestreos

En el gráfico 3 se muestran los perfiles serológicos para cada una de las infecciones en E2.

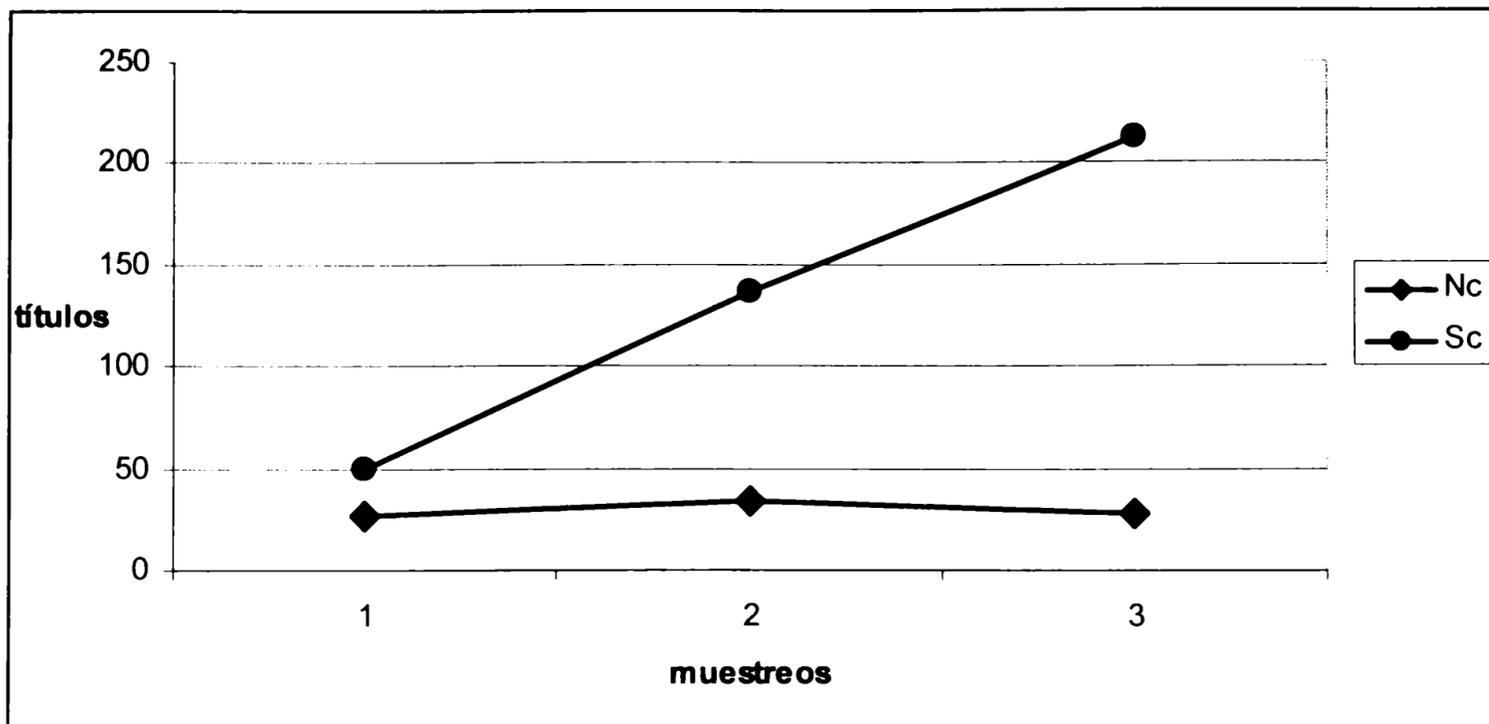


Gráfico 3: E2: Perfiles de la detección de anticuerpos para *N. caninum* y *S. cruzi* con valores promedio obtenidos en cada uno de los muestreos.

Ref: Nc: IFI con *N. caninum* como antígeno; Sc: IFI con *S. cruzi* como antígeno.

Las 43 vacas fueron positivas por IFI para el antígeno de *S. cruzi* (100%) y 31 (72 %) para *N. caninum*.

Los pesos de los terneros promediaron los 102, 144 y 188 Kg en los respectivos muestreos, con ganancias diarias promedio de 840 gr entre el primer y segundo muestreo y de 1030 gr entre el segundo y tercer muestreo.

No se detectaron diferencias significativas entre las ganancias de peso de los 2 grupos animales, separados en base a los títulos de IFI con antígeno de *S. cruzi*.

Acorde a los títulos de IFI para *N. caninum*, hubo 19 animales no infectados, 21 infectados y 3 dudosos. No se detectaron diferencias significativas en la GDP de los diferentes grupos.

E3: Las tablas 7 y 8 muestran la frecuencia de títulos para *S. cruzi* y *N. caninum*, respectivamente, en cada muestreo.

Tabla 7 : Distribución de los títulos de anticuerpos anti- *Sarcocystis* sp en E3.

M	Títulos								
	<25	25	50	100	200	400	800	1600	3200
1	1	34	25	6	3	0	0	0	0
2	0	21	36	11	3	0	0	0	0
3	0	9	28	14	20	1	0	0	0
4	0	5	20	18	15	12	2	0	0
5	0	3	8	25	18	13	2	2	1
6	0	1	4	21	16	17	6	6	1

M: muestreos

Tabla 8: Distribución de los títulos de anticuerpos anti- *N. caninum* en E3.

M	Títulos								
	<25	25	50	100	200	400	800	1600	3200
1	41	5	2	2	2	6	2	7	2
2	44	6	1	2	4	5	3	5	1
3	38	15	1	1	6	8	2	1	1
4	38	14	2	3	9	4	1	2	0
5	36	13	7	3	9	3	2	0	0
6	32	19	7	6	2	5	1	0	0

M muestreos

En el gráfico 4 se observan los perfiles serológicos trazados para cada una de las infecciones en E3.

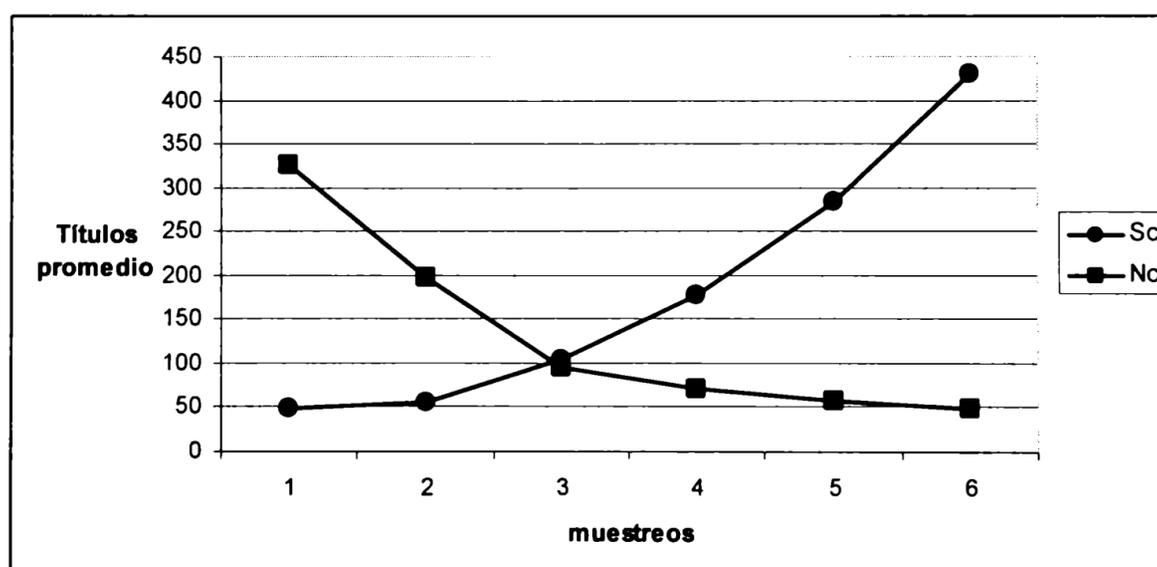


Gráfico 4: E3: perfiles de la detección de anticuerpos para *N. caninum* y *S. cruzi* con valores promedio obtenidos en cada uno de los muestreos.

En base a los títulos de IFI con antígeno de *S. cruzi* se diferenciaron dos grupos, uno de 33 animales (19 machos y 14 hembras) que presentó títulos mayores a 200 en los últimos muestreos y el otro de 36 animales (21 machos y 15 hembras) que presentaron títulos de 200 o menores en todos los muestreos. Las diferencias de ganancias diarias de peso (GDP) analizadas mediante ANOVA, fueron significativas ($p \leq 0,05$) en el quinto muestreo, con un promedio de 116 gramos por día más, en los animales con títulos 200 o menores. En el resto de los muestreos las diferencias de pesos y GDP no fueron significativas (Tabla 9).

Tabla 9: Pesos promedios (\bar{x}/Kg) y ganancias diarias de peso (GDP) en kg para cada uno de los dos grupos de animales según IFI para *S. cruzi*.

	Muestreos						
		1	2	3	4	5	6
> 200	\bar{x}/Kg	82,1	109,1	134,3	154,1	178,5	191,5
	GDP		0,793	0,700	0,708	0,843	0,419
≤ 200	\bar{x}/Kg	71,8	95,8	119,5	139,1	166,9	180,7
	GDP		0,707	0,657	0,701	0,959	0,446

En cuanto a la IFI para *N. caninum* hubo 24 de 69 (34,7%) animales no infectados, 20 fueron seronegativos en todas las muestras y 4 fueron seropositivos antes de los 150 días. Se consideraron infectados 45 de los 69 animales: 20 por vía transplacentaria (28,9%) ,15 (21.7%) por vía horizontal, con títulos 25 y 50 a partir de los 150 días y 10 (14,4%) sin identificar la vía de transmisión.

No se detectaron diferencias significativas en las ganancias diarias de peso entre los diferentes grupos.

Discusión:

Para ambas serologías se estimó que los anticuerpos detectados después de los 150 días de vida, son producidos por el propio ternero en respuesta a la infección, y no anticuerpos calostrales, considerando que estos tienen una vida media de 20 días **(110, 111)**.

La seropositividad en la IFI con *S. cruzi* como antígeno, en todos los animales de ambos muestreos, concuerda con los datos existentes provenientes de distintos puntos geográficos, que señalan que la prevalencia de esta especie puede llegar al 100 % **(2, 16-19)**.

Con el uso de la IFI para *N. caninum*, se consideraron infectados en E2 el 49% de los terneros y el 72% de las madres, y en E3 el 65% de los terneros. En otros trabajos con la misma técnica y título de corte se obtuvieron seroprevalencias de 73% en animales adultos **(128)** y 56% (14/25) en terneras de tambo a los 7 meses de edad **(Capítulo III)** ambos muy similares a los descritos para E2, de todos modos el porcentaje de terneros positivos en E3 fue superior, evidenciando una mayor exposición a *N. caninum* en este establecimiento.

Los perfiles serológicos de ambas infecciones presentaron características propias y relacionadas con las diferencias en las vías de transmisión. Para *Sarcocystis* sp se detectaron títulos ≥ 400 en el 2º y 3º muestreo de E2 y a partir del 3º muestreo de E3;

mientras que para *N. caninum* se detectaron títulos ≥ 800 , en los primeros muestreos y no en los últimos en ambos establecimientos.

El perfil serológico detectado mediante IFI con antígeno de *S. cruzi* en ambos establecimientos se corresponde con un patrón de infección horizontal, ya que los títulos continuaron elevándose individualmente durante el período en estudio y también aumentó la cantidad de animales infectados. Estos resultados indican que en la mayoría de los animales se superpuso la detección de anticuerpos calostrales con la de los anticuerpos generados frente a la infección, con un incremento marcado de los títulos de Ig G, a partir del cuarto mes de edad aproximadamente, sugiriendo que la infección ocurrió unos 30 a 45 días antes **(42, 46)**.

Los animales de menor edad con títulos más altos para *N. caninum* y que se mantuvieron positivos en todo el estudio, correspondieron a los infectados por vía transplacentaria, teniendo en cuenta que los títulos calostrales serían inferiores a los de infección **(Capítulo III)** y que partir de los 128 días de vida, no se detectarían anticuerpos calostrales **(111)**. Esto se corresponde con los reportes en donde los terneros infectados transplacentariamente permanecieron con títulos de anticuerpos detectables por muchos meses e incluso varios años **(111, 138)**.

De acuerdo a la evolución de los anticuerpos se pudo estimar en E3 que en una explotación de cría la proporción de transmisión transplacentaria fue de 28,9 %. Esta proporción es similar al 30% de seropositividad en muestras precalostro registrado en terneros de tambo usando la misma técnica diagnóstica **(Capítulo III)**. De todos modos

esta proporciones son superiores a las reportadas previamente en sueros fetales de nuestro país **(81)**.

En E2 la diferencia del 23% de seroprevalencia para *N. caninum* entre generaciones, podría atribuirse a la transmisión horizontal **(105, 132)**. En E3 se estimó una proporción de transmisión horizontal no menor al 21.7%. Estas estimaciones de transmisión horizontal son similares al 22 % reportado por Bjorkman y col. en 2003 en bovinos de carne usando un ELISA de avidez de IgG **(135)**. Si embargo estos porcentajes son muy superiores a los reportados por algunos autores en otros países **(83, 111, 130, 139)**, quizás debido al método diagnóstico empleado o a circunstancias propias de nuestro país, donde la presencia de perros en las explotaciones rurales es habitual. De hecho la alta prevalencia y la demostración de una eficiente transmisión horizontal de *S. cruzi* en el presente trabajo, sugieren que es muy frecuente la contaminación de las pasturas con heces de cánidos, siendo este un factor de riesgo para la infección con *N. caninum* **(94, 140)**. Por otro lado los animales infectados por vía horizontal tuvieron títulos bajos, al igual que lo descrito para terneras de tambo en el capítulo III, por lo que con técnicas diagnósticas menos sensibles podrían ser identificados como negativos. Este podría ser el caso de los trabajos donde la técnica diagnóstica empleada es el ELISA, que detectan una nula o mínima transmisión horizontal **(83, 111, 130, 139)**.

A pesar de considerarse a la transmisión transplacentaria de *N. caninum* como de mayor importancia y que los animales de tambo serían los más frecuentemente afectados **(69, 82)**, los resultados del presente trabajo indican una relevancia similar de

ambos tipos de transmisión en explotaciones de cría, y una transmisión vertical semejante en establecimientos de cría y tambo(**Capítulo III**).

En E3 se detectaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre terneros con títulos de IFI ≤ 200 y > 200 , esto sostiene la idea de que las pérdidas detectadas en infecciones experimentales **(37)** también podrían ocurrir en infecciones naturales en nuestro país. Se requieren más estudios de este tipo para identificar si las pérdidas ocurren en otras categorías animales, como así también si se detectan a gran escala o solo en establecimientos aislados.

En el presente estudio no se detectaron diferencias en la ganancia diaria de peso entre animales considerados infectados y negativos a *N. caninum*, quizás la infección transplacentaria de los terneros no ocasione pérdidas de peso detectables o el hecho de ser lactantes atenúe las posibles pérdidas. Esto último se basa en el hecho que en los casos que sí se han manifestado pérdidas en ganancia de peso debidas a la neosporosis, los bovinos examinados estaban ya destetados **(103, 136, 137)** prescindiendo de la influencia materna.

Son necesarios estudios de seguimiento serológico en otras categorías animales para evaluar las posibles pérdidas productivas en bovinos de nuestro país.

Este es el primer reporte de seguimiento serológico mediante IFI con antígenos de *S. cruzi* y *N. caninum*, en terneros de cría infectados naturalmente, y su relación con las diferentes vías de transmisión y la ganancia diaria de peso.

Capitulo V

Diagnóstico serológico y molecular de *S.cruzi* y *N. caninum* en abortos y mortalidad neonatal

Diagnóstico serológico y molecular de *S. cruzi* y *N. caninum* en abortos y mortalidad neonatal.

Introducción:

La neosporosis es reconocida actualmente como una de las causas más importantes de abortos en bovinos en el mundo y también se la menciona como causal de signos neurológicos en terneros y de mortalidad neonatal **(67, 68, 71, 97)**. La sarcocystosis bovina está ampliamente difundida y generalmente es de presentación subclínica, aunque algunos autores consideran a *Sarcocystis cruzi* como posible causal de abortos **(2, 31, 32)**.

En un reporte de casuística de abortos en bovinos de nuestro país, cerca del 7,4% se atribuyen a *N. caninum* y aproximadamente en el 55% de los abortos que se remiten al laboratorio no es posible determinar el agente causal **(102)**. La dificultad de recolección, la contaminación y la autólisis de los fetos a campo son algunas de las causas de estas fallas en el diagnóstico **(102, 105)**.

Para el diagnóstico de *N. caninum* en abortos se utilizan métodos serológicos en sueros maternos y fetales, pruebas de IHQ y más recientemente la técnica de PCR en tejidos fetales **(105)**. Para el caso de *S. cruzi* en los escasos reportes de diagnóstico de abortos se utilizaron técnicas histológicas, IHQ y métodos serológicos **(31, 32)**.

Las técnicas histológicas son útiles para detectar lesiones en las muestras de órganos fetales y placentas, aunque suelen ser poco sensibles para la observación de protozoos y además requieren que los tejidos no estén alterados por la autólisis **(105)**. Para los

métodos serológicos de suero o líquidos fetales es necesario considerar la edad gestacional, ya que el sistema inmune fetal es capaz de generar niveles detectables de anticuerpos a partir del quinto mes de gestación **(105, 110, 141)**. El PCR es un método promisorio con el que es posible detectar ADN de estos protozoos en tejidos fetales, aún estando autolisados y contaminados como así también en gestaciones tempranas **(53, 105, 142)**.

Materiales y métodos

Muestras:

Se recibió suero de 64 fetos abortados, provenientes del servicio de diagnóstico del INTA Balcarce. Los fetos, distribuidos por edad gestacional fueron: 4 de menos de 5 meses, 57 de más de 5 meses de gestación y 3 de los que no se informó la edad.

Del establecimiento lechero E1 se tomaron muestras de corazón, cerebro e hígado de: 4 natimortos, 2 abortos de 7 meses de edad gestacional y 1 ternero de 4 días de vida con debilidad generalizada. También se muestreo cerebro de 4 terneros machos a los 15 días del nacimiento, identificados como positivos precalostro (pc) por IFI para *N. caninum*, con títulos entre 200 y 800.

Además se obtuvieron muestras de 5 placentas de vacas con títulos de IFI para *N. caninum* ≥ 25 y cuyos terneros fueron sangrados precalostro.

Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta

Para la detección de anticuerpos para *N. caninum* y para *Sarcocystis* sp en el suero de los animales muestreados, se procedió acorde a lo descrito en el Anexo de técnicas

diagnósticas. Los sueros se diluyeron en PBS en base 2, desde 1/25 hasta dilución final. Se consideraron seropositivos todos los animales con título \geq a 25.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se tomaron 25-50 mg de tejido para la extracción de ADN, que se llevó a cabo con un kit comercial (DNeasy® Tissue Kit, QIAGEN, Hilden, Germany), acorde a las instrucciones de los fabricantes. Para *N. caninum* la amplificación se llevó a cabo con los primers específicos Np6 y Np21 **(123-125)** y para *S. cruzi* con los primers Sarco F y Sarco R, específicos del género *Sarcocystis* y posteriormente se sometió a digestión con enzimas de restricción para identificar la especie **(53)**. En ambas reacciones de PCR se siguieron las instrucciones expuestas en el Anexo de técnicas empleadas.

Resultados:

Inmunofluorescencia indirecta

De los sueros provenientes de INTA Balcarce, un 11% (7/64) de los fetos fueron positivos para IFI de *N. caninum* con títulos entre 25 y 400, 6 de los terneros positivos tenían 5 o más meses de gestación y 1 de edad sin informar. Un feto de 6 meses de gestación resultó positivo a título 25 para IFI con antígeno de *S. cruzi*.

La IFI para *N. caninum* de animales del E1, dio como positivos a 2 de los natimortos con títulos de 100 y 6400, mientras que el resto fueron negativos.

Todos los animales fueron negativos a la IFI para *S. cruzi*.

PCR

Por PCR para *N. caninum* solamente fue positivo el cerebro del natimorto con título de IFI 6400. En la tabla 10 se muestra el resultado de PCR de las placentas comparado al título de IFI para *N. caninum* de la madre y del ternero precalostro.

Tabla 10: Comparación del título IFI para madre e hijo versus PCR en placentas, para *N. caninum*.

IFI madre	IFI ternero	PCR
25	0	Negativo
25	25	Positivo
100	0	Positivo
200	200	Positivo
1600	12800	Positivo

Todas las muestras de fetos, terneros y placentas fueron negativas a la técnica de PCR para *Sarcocystis* sp.

Discusión

La presencia de anticuerpos en un 11% de los fetos abortados se relaciona con el 7,5% informado por Campero y col en 2003, donde la técnica usada como confirmatoria del aborto fue la IHQ **(102)**. De todos modos la serología positiva en sueros fetales confirma la transmisión transplacentaria de la infección pero no confirma a *N. caninum* como causa del aborto **(105)**. El descarte de otras enfermedades abortivas y la presencia de lesiones características asociadas a la presencia del protozoo en tejidos fetales si permiten arribar a un diagnóstico de *N.caninum* como causal **(105)**.

La detección de un feto positivo por IFI a *S. cruzi* en el presente trabajo es la primera en Argentina, aunque debemos considerar que la presencia del protozoo en los tejidos no fue puesta en evidencia. Los sueros de fetos de menos de 5 meses de gestación presentados en el presente trabajo resultaron negativos para ambas serologías, pero esto no descarta la posibilidad de infección con *S. cruzi* o *N. caninum* debido a la falta de inmunocompetencia fetal **(105, 110, 141)**.

La detección de ADN de *N. caninum* mediante PCR en 4 de 5 placentas confirma la presencia del agente causal en el tejido y su posible pasaje a los fetos, aún en vacas con títulos de IFI bajos (entre 25 y 100). La confirmación por PCR de la presencia de *N. caninum* en un feto positivo precalostro por IFI se suma a las ya presentadas en nuestro país **(122)**, confirmando a la técnica de PCR como de utilidad en el diagnóstico específico de la infección por *N. caninum* en fetos **(105)**.

A pesar de que *S. cruzi* es considerado causal de abortos **(2, 31, 32)**, en el presente trabajo no se detectaron tejidos fetales positivos para *S. cruzi* mediante PCR. Hacen falta estudios con un mayor número de animales para poder determinar la posibilidad de ocurrencia de abortos por este protozoo en nuestro país.

Capítulo VI

Conclusiones

Conclusiones

La infección por Sarcocystis sp

En base a los datos parasitológicos y serológicos obtenidos, se concluye que la prevalencia de *Sarcocystis sp* en bovinos de tambo y de cría de nuestro país es muy elevada, ya que en todos los muestreos realizados el 100 % de los animales mayores a 6 meses resultaron positivos. La elevada prevalencia de quistes de *S. cruzi* en miocardio (100%) en bovinos de la provincia de Buenos Aires, es comparable a la prevalencia reportada por autores de otros países **(2, 17)**.

El perfil serológico de los terneros de cría, con aumento del título individual y de la cantidad de animales positivos; y por otro lado la baja transmisión transplacentaria puesta en evidencia en terneros de tambo, confirman que la transmisión horizontal es la principal vía de transmisión de *S. cruzi*. La participación de los perros en la transmisión ocurriría entonces muy frecuentemente en todo nuestro medio rural, al igual que en otros países**(2, 16-19)**, pero hay que considerar también que los zorros y otros cánidos silvestres pueden comportarse como hospedadores definitivos, aumentando las posibilidades de contaminación de las pasturas **(2, 7)**. Así como el hecho que la esporogonia tiene lugar en el intestino del hospedador definitivo, y además cuando se eliminan los esporocistos, en grandes cantidades y durante períodos no menores a 60 días **(10)** son resistentes e infectantes para los bovinos **(143)**.

La infección por N. caninum

Para el diagnóstico de neosporosis, salvo excepciones, no se utilizan las diluciones 1:25 y 1:50 para IFI. En el presente trabajo se evidenció que animales con títulos

considerados bajos (25 a 100) pueden transmitir transplacentariamente y tejidos de estos animales, tales como placenta, resultar positivos por PCR.

La ausencia de reacción cruzada entre los títulos de IFI de *N. caninum*, *T. gondii* y *Sarcocystis* sp ha sido reportada en animales infectados experimentalmente(48) y en el presente trabajo en animales infectados naturalmente (128).

El título de corte 25 para IFI fue propuesto anteriormente como indicador de infección en sueros fetales (131), y de acuerdo a los resultados del presente trabajo, se justifica su aplicación como indicador de infección en animales adultos. De esa manera se ampliaría el margen de seguridad cuando es necesario seleccionar animales no infectados para reposición, transplante embrionario u otros fines.

Sin embargo, teniendo en cuenta que una baja proporción de animales infectados puede no ser detectado utilizando dicho título, como se evidenció por el nacimiento de un ternero precalostro positivo de una madre negativa (**Capítulo III**), será necesario contar con técnicas complementarias para incrementar la sensibilidad de la detección.

Para el diagnóstico serológico de neosporosis en vacas habrá que considerar que a mayor título, la proporción de transmisión transplacentaria es más alta (**Capítulo III**) y por consiguiente será mayor la probabilidad de abortar, tal como fuera señalado por otros autores (105).

El perfil serológico para terneros de explotaciones de cría, representado por una línea que declina a través del tiempo estuvo condicionado por los títulos altos de los terneros infectados transplacentariamente, que descendieron progresivamente y por los infectados por vía horizontal, que presentaron títulos bajos (25 y 50).

Se estimó que la transmisión vertical para *N. caninum* fue del 30 % y 28,9% en terneros tambo y cría respectivamente. La transmisión horizontal para los bovinos de la explotación lechera se estimó que fue del 47% y para los terneros de cría entre el 21,7 y 23%.

Acorde a los resultados de los exámenes de las muestras precalostro en terneros de tambo y a los perfiles serológicos trazados para los terneros de cría, se puede aceptar la primera hipótesis que dice que: “la transmisión horizontal predomina sobre la transplacentaria en las infecciones por *Sarcocystis cruzi*”. Acerca de la segunda hipótesis “la transmisión transplacentaria predomina sobre la horizontal en las infecciones por *Neospora caninum*” se destaca que a pesar de que se considera que la transmisión transplacentaria es la vía más importante de la diseminación de *N. caninum* (71), en estos estudios la frecuencia de ambos tipos de transmisión fue similar o mayor la horizontal como ocurrió en los animales de tambo, por lo que esta vía sería en ciertos casos la más importante. Se desconoce cuales son las causas por las cuales la transmisión horizontal fue tan elevada, quizás se deba a condiciones propias de nuestro medio rural en donde la presencia de perros y el contacto interespecífico son muy frecuentes, pero señala la necesidad de que los planes de control sean diferentes a los propuestos en otros países en donde predomina la vía transplacentaria (71). Los perfiles serológicos trazados para ambas infecciones, que fueron descritos anteriormente, tuvieron características propias para cada una de las infecciones acordes a la vía de transmisión por lo que podemos aceptar la tercera hipótesis “los perfiles serológicos se corresponden con la forma de transmisión”.

En cuanto a la cuarta hipótesis que dice que “las infecciones por *Sarcocystis cruzi* y *Neospora caninum* están asociadas con una disminución de la ganancia de peso en terneros de cría de la República Argentina” se considera por partes.

Se detectaron pérdidas en las infecciones por *S. cruzi* comparando animales con títulos de IFI > a 200 y con títulos de 200 o menores. Esto soporta la idea de que las pérdidas detectadas en infecciones experimentales con *S. cruzi* **(37)** también podrían ocurrir en infecciones naturales en nuestro país, pero sería necesario efectuar más estudios de para determinar si en otras condiciones ,como diferentes tipo de explotación o diferentes categorías de animales ,ocurren pérdidas económicas detectables.

No se detectaron diferencias entre terneros de cría infectados y no infectados con *N. caninum*, quizás la infección de los terneros no ocasione pérdidas de peso detectables. Esto último se soporta en el hecho que en los casos que se han manifestado pérdidas en ganancia de peso debidas a la neosporosis, los bovinos examinados eran adultos **(103, 136, 137)**.

La quinta hipótesis sostenía que:”En fetos abortados se detectan anticuerpos anti-*Sarcocystis* y/o ADN de *Sarcocystis cruzi*”; Esta es la primera comunicación de la detección de anticuerpos para *S. cruzi* en terneros precalostro y en un feto abortado. Ambas detecciones indican la existencia de transmisión transplacentaria y por lo tanto, la posibilidad de ocurrencia de abortos como ha sido propuesta por otros autores**(31-33)**. Sin embargo la detección de anticuerpos en sueros precalostro de terneros viables abre interrogantes sobre el curso de la infección transmitida por esta vía. Serán necesarios más estudios para conocer este aspecto y para confirmar que *S. cruzi* es agente causal de abortos en bovinos en Argentina.

Anexo

Técnicas empleadas

Diagnóstico de Sarcocystosis

Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta

Materiales:

Solución buffer de fosfatos (PBS)

Solución madre:

Cloruro de sodio (NaCl).....	40 g
Cloruro de potasio (KCl).....	1 g
Fosfato disódico(Na ₂ HPO ₄).....	5,75 g
Fosfato de potasio (KH ₂ PO ₄).....	1 g
Agua destilada.....	csp.500 ml

Solución de trabajo: utilizar la solución madre diluida 1:10 en agua destilada. El pH final será de 7,2.

Solución salina (10X)

Cloruro de sodio (NaCl).....	8,5 g
Agua destilada.....	csp 100 ml

Antígeno: bradizoitos de *Sarcocystis cruzi* obtenidos por digestión artificial de músculo cardíaco de bovinos con alta carga de quistes de pared fina.

Equipos e instrumental:

Picadora de carne, agitador magnético, vaso de precipitado de 1l, tamices de 300, 150 y 53 micras; tubos de centrifuga de 50 ml, centrifuga, freezer de -20°C.

Cámara húmeda, estufa de cultivo, placas de 96 pocillos para preparar diluciones, probetas, micropipetas y tips, recipientes para el lavado de portaobjetos, microscopio de fluorescencia.

Procedimientos:

Preparación del antígeno:

- 1- Mezclar 100 g de músculo cardíaco molido en picadora de carne con 400 ml de solución de digestión (pepsina 2,5% y ácido clorhídrico (HCl) 1% en agua destilada).
- 2- Mantener a 37° C en agitador magnético durante 20 minutos.
- 3- Filtrar a través de tamices de 300, 150 y 53 micras.
- 4- Colocar en tubos de centrifuga de 50 ml y centrifugar a 500 g por 5 minutos.
- 5- Eliminar el sobrenadante y la capa superior oscura del sedimento.
- 6- Resuspender en 30 ml de PBS.
- 7- Purificar el material usando la técnica de gradientes de Percoll (Pharmacia Sweden), mezclando 30 ml de suspensión de antígeno con 15 ml de Percoll isotónico (9 partes de Percoll más 1 parte de solución salina 10x).
- 8- Centrifugar a 4000 rpm durante 20 minutos. Los bradizoitos forman un sedimento blanco y los restos de fibras musculares quedan en la parte superior del tubo. Eliminar el sobrenadante y lavar 3 veces con PBS.
- 9- Resuspender el último lavado en 5 ml de PBS, y contar los bradizoitos en cámara de Neubauer. Ajustar el volumen a 4×10^6 bradizoitos por ml.

10- Colocar en pocillos de portaobjetos de Inmunofluorescencia, una gota de 15 microlitros, luego de unos segundos aspirar el exceso de líquido.

11-Dejar secar y colocar en freezer a -20°C, hasta su utilización.

Inmunofluorescencia indirecta:

1-Diluir el suero en PBS desde 1:25, en base 2 hasta dilución final.

2-Incubar el antígeno con el suero problema a 37 °C durante 30 minutos.

3-Lavar con solución PBS durante 10 minutos en agitación.

4-Incubar con el conjugado anti-IgG especie-específica (Sigma, Bio Sciences, St. Louis, MO, USA) 30 minutos a 37 °C.

5-Lavar con solución PBS durante 10 minutos en agitación.

6-Montar con glicerina/ buffer de carbonatos (1/10).

7-Observar con microscopio de fluorescencia.

Para cada rutina se usó como control positivo suero de bovinos infectados naturalmente y como control negativo suero fetal. Se consideró como resultado positivo a la fluorescencia de toda la superficie de los bradizoítos (**Foto 3, pag 99**).

Técnica de PCR

Materiales

Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA)

Solución madre (5X)

Tris base.....	54 g
Acido bórico.....	27,5 g
EDTA 0,5 M (PH: 8).....	20 ml
Agua destilada.....	csp 1 l

Geles de Agarosa al 1,5 %

Agarosa.....	0,6 gr
TBE 1X.....	40 ml

Colocar la mezcla en el microondas hasta que empiece a hervir. Dejar enfriar y colocar en soporte para geles.

Equipos e instrumental:

Microcentrífuga, micropipetas y tips con filtro, baño María a 50°C y 70°C, termociclador.

Cuba de electroforesis horizontal, soporte para geles, transiluminador UV.

Procedimiento

1- Extracción de ADN con un kit comercial de extracción de ADN (DNeasy® Tissue Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) acorde con las instrucciones del fabricante; lisis con proteinasa K durante toda la noche.

2-Amplificación: mediante la técnica de Yang y col (2002) con primers similares a los descritos por estos autores, (amplifican fragmentos específicos del gen del 18s rRNA, del género *Sarcocystis*) **(53)**. Secuencia de los Primers utilizados:

Sarco F 5'CGCAAATTACCCAATCCTGA 3'

Sarco R 5'ATTTCTCATAAGGTGCAGGAG 3'

3-Preparación del master mix:

- ADN genómico	2 µl
- 10x PCR buffer con KCl (Fermentas, Hanover, USA)	5 µl
- MgCl (Fermentas, Hanover, USA)	5 µl
- Nucleótidos (dNTPs): stock 10 mM	1 µl
- <i>Taq</i> ADN polimerasa (recombinante, 5u/µl, Fermentas)	0.3 µl
- Sarco F (stock 100 µM)	1 µl
- Sarco R (stock 100 µM)	1 µl
- Agua bidestilada hasta completar un volumen final de 50 µl.	

4- Colocar en termociclador (PCR Sprint. THERMO Electron Corporation) con el siguiente programa:

Desnaturalización inicial: 95° C por 2 minutos

40 ciclos programados: -desnaturalización 94° C; 40 segundos

-alineamiento 57° C; 30 segundos

-extensión 72° C; 60 segundos

Extensión final: 72° C por 6 minutos

5- Electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % en buffer TBE, durante 1 hora, se pondrán en evidencia las bandas de ADN amplificadas mediante tinción con bromuro de etidio y observación con transiluminador UV. Las bandas son de aproximadamente 700 pb (**Foto 7, pág. 101**).

En cada ciclo de amplificación se colocarán como control positivo ADN de *S. cruzi* y como control negativo master mix mas agua bidestilada.

5-Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP): digerir con las enzimas de restricción *Bcl* I y *Rsa* I (Fermentas, Hanover, USA). Mezclar 5 µl de los amplificados con 5 U de enzima (10 U/ µl) más 2 ul del buffer apropiado para cada enzima (10X) y completar a 20 ul con agua libre de nucleasas. Cada amplificado se someterá a corte con cada enzima por separado.

6- Incubar a 37°C de 1 a 16 hs.

7- Repetir electroforesis en agarosa al 1,5 %.

8-Los amplificados de cada especie de *Sarcocystis* presentan fragmentos diferentes; *S. hominis* no se corta con ninguna de las dos enzimas, *S. cruzi* se corta solo con *Rsa* I y *S. hirsuta* se corta con ambas enzimas (**53**).

Diagnóstico de Neosporosis

Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta

Materiales

Solución buffer de carbonatos (Rinse buffer)

Solución madre:

Carbonato de sodio (Na_2CO_3).....	11,4 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3).....	33,6 g
Cloruro de sodio (NaCl).....	8,5 g
Agua destilada.....	csp 1 l

El pH es de 9.

Solución de trabajo: diluir la solución madre en agua destilada en proporción de 1: 4.

Antígeno: taquizoitos del aislamiento NC-1 de Dubey y col. 1988 **(55)** cultivados en células VERO, en el Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

Equipos e instrumental:

Cámara húmeda, estufa de cultivo, placas de 96 pocillos para preparar diluciones, probetas, micropipetas y tips, recipientes para el lavado de portaobjetos, microscopio de fluorescencia.

Procedimiento

1. Diluir el suero en PBS desde 1:25, en base 2 hasta dilución final.
2. Incubar el antígeno con el suero problema a 37 °C durante 30 minutos.
3. Lavar con solución buffer de carbonatos durante 10 minutos en agitación.
4. Incubar con el conjugado anti-IgG bovina producido en conejo (Sigma, Bio Sciences, St. Louis, MO, USA) 30 minutos a 37 °C.
5. Lavar con buffer de carbonatos durante 10 minutos en agitación.
6. Montar con glicerina/ buffer de carbonatos (1/10).
7. Observar en el microscopio de fluorescencia.

Para cada rutina se uso como control positivo suero de una vaca infectada experimentalmente y como control negativo suero fetal. Se consideró como reacción positiva, la fluorescencia de toda la superficie del merozoito **(Foto 4, pag 99) (117)**.

Técnica de PCR

Material

Geles de poliacrilamida al 6 %

Agua destilada.....	9 ml
TBE 5X.....	3 ml
Poliacrilamida 30% (19:1).....	3 ml
APS (persulfato de Amonio).....	150 µl
TEMED*	15 µl

*N,N,N,N-Tetra-methyl-ethylenediamine

Equipos e instrumental:

Microcentrífuga, micropipetas y tips con filtro, baño María a 50°C y 70°C, termociclador.

Cuba de electroforesis vertical.

Procedimiento

1- Extracción de ADN con un kit comercial de extracción de ADN (DNeasy® Tissue Kit, QIAGEN, Hilden, Germany) acorde con las instrucciones del fabricante; lisis con proteinasa K durante toda la noche.

2-Amplificación con el par de *primers* específicos de *N. caninum*: Np 6-Np 21(**123-125**).

3-Preparación de la mezcla madre (master mix):

- ADN genómico	1 µl
- 10x PCR buffer con KCl (Fermentas, Hanover, USA)	2.5 µl
- Nucleótidos (dNTPs): dATP, dTTP, dGTP y dCTP	200 µM
- <i>Taq</i> ADN polimerasa (recombinante, 5u/µl, Fermentas)	0.15 µl
- Np6	0.4 µM
- Np21	0.4 µM
- Agua bidestilada hasta completar un volumen final de 25 µl.	

4- Colocar los tubos termociclador (PCR Sprint. THERMO Electron Corporation) con el siguiente programa:

Desnaturalización inicial:	94° C por 5 minutos
35 ciclos programados:	-desnaturalización 94° C; 30 segundos
	-alineamiento 55° C; 30 segundos
	-extensión 72° C; 60 segundos
Extensión final:	72° C por 7 minutos

5- Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6 % y tinción con nitrato de Plata **(126)** para poner en evidencia los productos de 328 pb **(Foto 8, pág 101)**.

En cada ciclo de amplificación se colocaron como control positivo ADN de *N. caninum* (cepa Nc1) y como control negativo master mix mas agua bidestilada.

Técnica de Inmunohistoquímica para *N. caninum*

Materiales

Soluciones de alcohol etílico 100%, 96%, 70% y 50%; xileno; recipientes para las soluciones y gradillas para portaobjetos. Anticuerpo primario anti *N. caninum*.

Procedimiento

Para la tinción inmunohistoquímica se utilizó un kit comercial LSAB + System HRP (Dako Cytomation, Carpinteria, USA). Se siguieron las instrucciones de los fabricantes; incubación del anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C.

Primera parte:

1. Desparafinar los cortes de tejido (3-5 μ m) con xileno:
 - a) sumergir en xileno 20 minutos
 - b) sumergir en xileno 5 minutos
2. Eliminar el xileno e hidratar:

Sumergir en gradientes decrecientes de etanol durante 5 minutos (100%, 96%, 70%, 50%).

Sumergir en agua destilada, dos veces durante 5 minutos.
3. Bloquear la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%.
4. Bloqueo de reacciones inespecíficas (opcional):

Incubar con suero normal diluido, de cabra (3 gotas de stock + 10 ml PBS) durante 30 minutos.

Eliminar el suero mediante inversión y secar cuidadosamente alrededor de los cortes.

5. Aplicar el anticuerpo primario (Suero hiperinmune anti-*Neospora* hecho en conejo, cedido por el Dr Dubey, J.P.) diluido 1 / 2000 sobre el corte.

Incubar toda la noche a 4° C.

Segunda parte:

6. Eliminación de anticuerpos primarios no fijados:

Enjuagar por goteo con PBS.

Sumergir en PBS 10 minutos.

Dejar escurrir y secar cuidadosamente alrededor de los cortes.

7. Aplicar el anticuerpo secundario biotinilado universal (Anticuerpos anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra biotinilados):

Cubrir el corte con el Biotinylated Link universal (amarillo) del Kit.

Incubar durante 30 minutos.

Enjuagar por goteo con PBS.

Sumergir en PBS 10 minutos.

Secar cuidadosamente alrededor de los cortes.

8. Agregar la Estreptavidina-Peroxidasa:

Colocar cantidad suficiente del líquido rojo del Kit (Streptavidin-HRP) para cubrir el corte.

Incubar 30 minutos.

Enjuagar y lavar como en los pasos anteriores.

9. Solución sustrato- cromógeno:

Aplicar la solución preparada de DAB + cromógeno.

Dejar actuar 1 minuto o hasta la aparición de color marrón claro en el corte.

Lavar con agua destilada desde botella de lavado y sumergir en agua destilada.

10. Tinción de contraste (opcional):

Teñir con hematoxilina de Meyer el tiempo necesario para lograr el contraste.

Lavar en agua de grifo.

11. Deshidratar:

Sumergir en gradientes crecientes de etanol durante 2 minutos (50%, 70%, 96%, 100%).

Sumergir en xileno 2 minutos.

12. Montar en bálsamo sintético y observar al microscopio.

Referencias Bibliográficas

1. Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1996;67(1-2):1-59.
2. Dubey JP, Speer CA, Fayer R. *Sarcocystosis of animals and man*. Boca Raton, Florida: CRC press; 1989.
3. Basso W, Venturini L, Venturini MC, Hill DE, Kwok OC, Shen SK, et al. First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *J Parasitol* 2001;87:612-618.
4. Fayer R. *Sarcocystis* spp. in human infections. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(4):894-902.
5. Giles RC, Tramontin R, Kadel WL, Whitaker K, Miksch D, Bryant DW, et al. *Sarcocystosis in cattle in Kentucky*. *J Am Vet Med Assoc* 1980;176(6):543-548.
6. Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJ, Reed SM, Granstrom DE, Speer CA. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Vet Parasitol* 2001;95(2-4):89-131.
7. Tenter AM. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *Int J Parasitol* 1995;25(11):1311-1330.
8. Gajadhar AA, Marquardt WC. Ultrastructural and transmission evidence of *Sarcocystis cruzi* associated with eosinophilic myositis in cattle. *Can J Vet Res* 1992;56(1):41-6.
9. Tenter AM, Barta JR, Beveridge I, Duszynski DW, Mehlhorn H, Morrison DA, et al. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int J Parasitol* 2002;32(5):595-616.
10. Fayer R. Production of *Sarcocystis cruzi* sporocysts by dogs fed experimentally infected and naturally infected beef. *J Parasitol* 1977;63(6):1072-5.
11. Dubey JP, Speer CA, Douglass TG. Development and ultrastructure of first-generation meronts of *Sarcocystis cruzi* in calves fed sporocysts from coyote feces. *J Protozool* 1980;27(4):380-7.
12. Dubey JP. Development of ox-coyote cycle of *Sarcocystis cruzi*. *J Protozool* 1982;29(4):591-601.
13. Dubey JP. Development of ox-cat cycle of *Sarcocystis hirsuta*. *Proc Helminthol Soc Wash* 1982;49(2):295-304.
14. Dubey JP, Udtujan RM, Cannon L, Lindsay DS. Condemnation of beef because of *Sarcocystis hirsuta* infection. *J Am Vet Med Assoc* 1990;196 (7):1095-1096.
15. Dubey JP, Fayer R, Speer CA. Experimental *Sarcocystis hominis* infection in cattle: lesions and ultrastructure of sarcocysts. *J Parasitol* 1988;74:875-879.
16. Van Knapen F, Bouwman D, Greve E. Study on the incidence of *Sarcocystis* spp in Dutch cattle using various methods (in Dutch). *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 1987; 112:1095-1100.
17. Bottner A, Charleston WA, Pomroy WE, Rommel M. The prevalence and identity of *Sarcocystis* in beef cattle in New Zealand. *Vet Parasitol* 1987;24(3-4):157-68.

18. Vercruyssen J, Franssen J, van Goubergen M. The prevalence and identity of *Sarcocystis* cysts in cattle in Belgium. *Zentralbl Veterinarmed B* 1989;36(2):148-53.
19. Latif BM, Al-Delemi JK, Mohammed BS, Al-Bayati SM, Al-Amiry AM. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in meat-producing animals in Iraq. *Vet Parasitol* 1999;84:85-90.
20. Fukuyo M, Battsetseg G, Byambaa B. Prevalence of *Sarcocystis* infection in meat-producing animals in Mongolia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002; 33 (3):490-495.
21. Woldemeskel M, Gebreab F. Prevalence of *Sarcocystis* in livestock of northwest Ethiopia. *Zentralbl Veterinarmed B* 1996;43 (1):55-58.
22. Savini G, Dunsmore JD, Robertson ID, Seneviratna P. The epidemiology of *Sarcocystis* spp. in cattle of Western Australia. *Epidemiol Infect* 1992;108:107-113.
23. Bertero S, Cursack R, Tossolini LE. Primeros muestreos sobre la frecuencia de quistes de *Sarcocystis* spp. en los mamíferos domésticos de consumo humano en la República Argentina. *Rev Med Vet* 1980;61(5):395-398.
24. Moriena RA, Santa Cruz CM. Sarcocystosis bovina en el Nordeste Argentino. *Vet Arg* 1989;6(51):35-39.
25. Ono M, Ohsumi T. Prevalence of *Sarcocystis* spp. cysts in Japanese and imported beef (Loin: *Musculus longissimus*). *Parasitol Int* 1999;48(1):91-4.
26. Ghisleni G, Robba S, Germani O, Scanziani E. Identification and prevalence of *Sarcocystis* spp. cyst in bovine canned meat. *Food Control* 2006;17:690-694.
27. Saito M, Shibata Y, Kubo M, Sakakibara I, Yamada A, Itagaki H. First isolation of *Sarcocystis hominis* from cattle in Japan. *J Vet Med Sci* 1999;61(3):307-309.
28. Pena HF, Ogassawara S, Sinhorini IL. Occurrence of cattle *Sarcocystis* species in raw kibbe from Arabian food establishments in the city of Sao Paulo, Brazil, and experimental transmission to humans. *J Parasitol* 2001;87(6):1459-65.
29. Wouda W, Snoep JJ, Dubey JP. Eosinophilic myositis due to *Sarcocystis hominis* in a beef cow. *J Comp Pathol* 2006;135:249-253.
30. Dubey JP. Clinical Sarcocystosis in calves fed *Sarcocystis hirsuta* sporocysts from cats. *Vet Pathol* 1983;49:295-304.
31. Hong CB, Giles RC, Jr., Newman LE, Fayer R. Sarcocystosis in an aborted bovine fetus. *J Am Vet Med Assoc* 1982;181(6):585-8.
32. Dubey JP, Bergeron JA. *Sarcocystis* as a cause of placentitis and abortion in cattle. *Vet Pathol* 1982;19(3):315-8.
33. Lopes CW, de Sa WF, Botelho GG. [Lesions in cross-breed pregnant cows, experimentally infected with *Sarcocystis cruzi* (Hasselmann, 1923) Wenyon, 1926 (Apicomplexa: Sarcocystidae)]. *Rev Bras Parasitol Vet* 2005;14(2):79-83.
34. Corner AH, Mitchell D, Meads EB, Taylor PA. Dalmeny Disease. An Infection of Cattle Presumed to be Caused by an Unidentified Protozoon. *Can Vet J* 1963;4(10):252-64.
35. Clegg FG, Beberley JK, Markson LM. Clinical disease in cattle in England resembling Dalmeny disease associated with suspected *Sarcocystis* infection. *J Comp Pathol* 1978;88(1):105-14.

36. Dauschies A, Rupp U, Rommel M. Blood clotting disorders during experimental sarcocystiosis in calves. *Int J Parasitol* 1998;28(8):1187-94.
37. Dauschies A, Hintz J, Henning M, Rommel M. Growth performance, meat quality and activities of glycolytic enzymes in the blood and muscle tissue of calves infected with *Sarcocystis cruzi*. *Vet Parasitol* 2000;88(1-2):7-16.
38. Dubey JP. Early developmental stages of *Sarcocystis cruzi* in calf fed sporocysts from coyote feces. *J Protozool* 1981;28(4):431-3.
39. Dubey JP, Speer CA, Charleston WA. Ultrastructural differentiation between sarcocysts of *Sarcocystis hirsuta* and *Sarcocystis hominis*. *Vet Parasitol* 1989;34:153-157.
40. Odening K, Wesemeier HH, Walter G, Bockhardt I. On the morphological diagnostics and host specificity of the *Sarcocystis* species of some domesticated and wild bovini (cattle, banteng and bison). *Appl Parasitol* 1995;36(3):161-78.
41. Chen LY, Zhou BJ, Yang ZQ, Li CY, Attwood SW, Wang WL, et al. Effects of frozen storage on the structure of sarcocysts in pig muscle and implications in taxonomic studies. *Exp Parasitol* 2007;115:393-398.
42. Lunde MN, Fayer R. Serologic test for antibody to *Sarcocystis* in cattle. *J Parasitol* 1977;63:222-225.
43. Tadros W, Laarman JJ. Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid coccidia. *Adv Parasitol* 1982;20:293-468.
44. Savini G, Dunsmore JD, Robertson ID. Evaluation of a serological test system for the diagnosis of *Sarcocystis cruzi* infection in cattle using *S. cruzi* merozoite antigen. *Vet Parasitol* 1994;51(3-4):181-9.
45. Fayer R, Dubey JP. Protective immunity against clinical sarcocystosis in cattle. *Vet Parasitol* 1984;15(3-4):187-201.
46. Gasbarre LC, Suter P, Fayer R. Humoral and cellular immune responses in cattle and sheep inoculated with *Sarcocystis*. *Am J Vet Res* 1984;45(8):1592-6.
47. Ugglia A, Buxton D. Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infections in ruminants: diagnosis and prospects for vaccination. *Rev Sci Tech* 1990;9(2):441-62.
48. Dubey JP, Lindsay DS, Adams DS, Gay JM, Baszler TV, Blagburn BL, et al. Serologic responses of cattle and other animals infected with *Neospora caninum*. *Am J Vet Res* 1996;57(3):329-36.
49. Ugglia A, Hilali M, Lovgren K. Serological responses in *Sarcocystis cruzi* infected calves challenged with *Toxoplasma gondii*. *Res Vet Sci* 1987;43(1):127-9.
50. Fischer S, Odening K. Characterization of bovine *Sarcocystis* species by analysis of their 18S ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 1998;84(1):50-4.
51. Kibenge FS, Cawthorn RJ, Despres D, McKenna PK, Markham RJ. Development of genomic probes to *Sarcocystis cruzi* (Apicomplexa). *Vet Parasitol* 1991;40(1-2):9-20.
52. MacPherson JM, Gajadhar AA. Specific amplification of *Sarcocystis cruzi* DNA using a randomly primed polymerase chain reaction assay. *Vet Parasitol* 1994;55(4):267-77.
53. Yang ZQ, Li QQ, Zuo YX, Chen XW, Chen YJ, Nie L, et al. Characterization of *Sarcocystis* species in domestic animals using a PCR-RFLP analysis of variation

- in the 18S rRNA gene: a cost-effective and simple technique for routine species identification. *Exp Parasitol* 2002;102(3-4):212-7.
54. Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd* 1984;70(2):271-4.
 55. Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* 1988;193:1259-1263.
 56. Thilsted JP, Dubey JP. Neosporosis-like abortion in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1989;1:205-209.
 57. Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198(2):241-4.
 58. Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA. Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. *Vet Pathol* 1991;28(2):110-6.
 59. Jardine JE. The ultrastructure of bradizoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet Parasitol* 1996;62:231-240.
 60. Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkas I, Bjorkman C, Blagburn BL, et al. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int J Parasitol* 2002;32(8):929-946.
 61. Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Wouda W. Evidence of post-natal transmission of *Neospora caninum* in Dutch dairy herds. *Int J Parasitol* 2001;31(2):209-15.
 62. McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 1998;28(9):1473-8.
 63. Gondim LF, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2004;34:159-161.
 64. Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 1999;82:327-333.
 65. Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol* 2003;41(1):1-16.
 66. Dubey JP, Lindsay DS. *Neospora caninum* induced abortion in sheep. *J Vet Diagn Invest* 1990;2:230-233.
 67. Barr BC, Conrad PA, Dubey JP, Anderson ML. Neospora-like encephalomyelitis in a calf: pathology, ultrastructure, and immunoreactivity. *J Vet Diagn Invest* 1991;3(1):39-46.
 68. Dubey JP, Leathers CW, Lindsay DS. *Neospora caninum*-like protozoon associated with fatal myelitis in newborn calves. *J Parasitol* 1989;75(1):146-8.
 69. Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD, Sverlow KW, Packham AE, Barr BC, et al. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp infection in dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1997;210(8):1169-72.
 70. Trees AJ, Williams D. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol* 2005;21(12):558-561.

71. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 2007;20(2):323-67.
72. Baillargeon P, Fecteau G, Pare J, Lamothe P, Sauve R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. J Am Vet Med Assoc 2001;218(11):1803-6.
73. Campero CM, Moore DP, Lagomarsino H, Odeon AC, Castro M, Visca H. Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2003;50(9):458-60.
74. Ortega-Mora LM, Ferre I, del-Pozo I, Caetano-da-Silva A, Collantes-Fernandez E, Regidor-Cerrillo J, et al. Detection of *Neospora caninum* in semen of bulls. Vet Parasitol 2003;117(4):301-8.
75. Caetano-da-Silva A, Ferre I, Collantes-Fernandez E, Navarro V, Aduriz G, Ugarte-Garagalza C, et al. Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls. Theriogenology 2004;62(7):1329-36.
76. Serrano E, Ferre I, Osoro K, Aduriz G, Mateos-Sanz A, Martinez A, et al. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. Vet Parasitol 2006;135(3-4):197-203.
77. Serrano-Martinez E, Ferre I, Osoro K, Aduriz G, Mota RA, Martinez A, et al. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. Theriogenology 2007;67(4):729-37.
78. Dubey JP, Buxton D, Wouda W. Pathogenesis of bovine neosporosis. J Comp Pathol 2006;134(4):267-89.
79. Canada N, Meireles CS, Ferreira P, Correia da Costa JM, Rocha A. Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. Vet Parasitol 2006;139(1-3):109-14.
80. Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol 1999;84:349-367.
81. Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, Echaide I, Basso W, et al. *Neospora caninum* infections in bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. Int J Parasitol 1999;29(10):1705-8.
82. Moore DP. Neosporosis in South America. Vet Parasitol 2005;127:87-97.
83. Waldner CL, Janzen ED, Ribble CS. Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. J Am Vet Med Assoc 1998;213(5):685-90.
84. Moore DP, Campero CM, Odeon AC, Chayer R, Bianco MA. Reproductive losses due to *Neospora caninum* in a beef herd in Argentina. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2003;50(6):304-8.
85. Dubey JP. Neosporosis in cattle. J Parasitol 2003;89 (Suppl.):S42-S56.
86. Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blanchard PC, Breitmeyer RE, et al. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J Am Vet Med Assoc 1995;207(9):1206-10.

87. Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum* epidemic abortion in cows and evidence for congenital and post-natal transmission. *J Vet Diagn Invest* 1997;9:44-49.
88. Thurmond MC, Hietala SK. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am J Vet Res* 1997;58:1381-1385.
89. Jensen AM, Bjorkman C, Kjeldsen AM, Wedderkopp A, Willadsen C, Uggla A, et al. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev Vet Med* 1999;40(3-4):151-63.
90. Thurmond MC, Hietala SK. Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. *Am J Vet Res* 1996;57:1559-1562.
91. Stenlund S, Kindahl H, Magnusson U, Uggla A, Björkman C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol* 1999;85:227-234.
92. Barling KS, McNeill JW, Thompson JA, Paschal JC, McCollum FT, Craig TM, et al. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J Am Vet Med Assoc* 2000;217:1356-1360.
93. Barling KS, Lunt DK, Snowden KF, Thompson JA. Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers. *J Am Vet Med Assoc* 2001;219:1259-1262.
94. Dijkstra T, Barkema HW, Hesselink JW, Wouda W. Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. *Vet Parasitol* 2002;105(2):89-98.
95. Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. *Can J Vet Res* 1996;60(2):133-9.
96. Bacigalupe DV, M. C.; Unzaga, J. M.; Machuca, M.; Di Lorenzo, C.; Abdala, A.; Guglielmone, A.; Basso, W.; Venturini, L. Infecciones transplacentarias por *Neospora caninum* en bovinos. XVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. 1998;TL.e26:143.
97. Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, Sverlow K, Anderson ML, Reynolds J, et al. Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). *J Am Vet Med Assoc* 1993;202(1):113-7.
98. Dubey JP, Lahunta D. Neosporosis associated congenital limb deformities in a calf. *Appl Parasitol* 1993;34:229-233.
99. Dubey JP, Hartley WJ, Lindsay DS. Congenital *Neospora caninum* infection in a calf with spinal cord anomaly. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:1043-1044.
100. Bartels CJ, van Schaik G, Veldhuisen JP, van den Borne BH, Wouda W, Dijkstra T. Effect of *Neospora caninum*-serostatus on culling, reproductive performance and milk production in Dutch dairy herds with and without a history of *Neospora caninum*-associated abortion epidemics. *Prev Vet Med* 2006;77(3-4):186-98.
101. Venturini L, Di Lorenzo C, Venturini MC, Romero J. Anticuerpos anti *Neospora sp* en vacas que abortaron. *Vet Arg* 1995;12:167- 170.

102. Campero CM, Moore DP, Odeon AC, Cipolla AL, Odriozola E. Aetiology of bovine abortion in Argentina. *Vet Res Commun* 2003;27(5):359-69.
103. Venturini L, Boero C, Basso W, Venturini MC, Moreno H. Neosporosis en terneros de un feed-lot: su evolución y efectos asociados en la ganancia de peso. In: XVI^a Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Diagnóstico; 2002; Córdoba, Argentina; 2002. p. E-16.
104. Thurmond MC, Hietala SK. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first- lactation dairy cows. *J Am Vet Med Assoc* 1997;210:672-674.
105. Dubey JP, Schares G. Diagnosis of bovine Neosporosis. *Vet Parasitol* 2006;140:1-34.
106. Wouda W, Moen AR, Visser IJ, van Knapen F. 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. *J Vet Diagn Invest* 1997;9(2):180-5.
107. Conrad PA, Sverlow K, Anderson M, Rowe J, BonDurant R, Tuter G, et al. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *J Vet Diagn Invest* 1993;5(4):572-8.
108. Schares G, Rauser M, Zimmer K, Peters M, Wurm R, Dubey JP, et al. Serological differences in *Neospora caninum*-associated epidemic and endemic abortions. *J Parasitol* 1999;85(4):688-94.
109. Ugglá A, Stenlund S, Holmdahl OJ, Jakubek EB, Thebo P, Kindahl H, et al. Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int J Parasitol* 1998;28(9):1467-72.
110. Penninpede EFF, Gómez CM, Stanchi NO. Introducción a la Inmunobiología. Primera ed. La Plata, Argentina; 2004.
111. Hietala SK, Thurmond MC. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1669-76.
112. Bjorkman C, Ugglá A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1497-507.
113. Bjerkas I, Jenkins MC, Dubey JP. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of neosporosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1(2):214-21.
114. Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Gottstein B, Hentrich B. Identification and partial characterization of a 36 kDa surface protein on *Neospora caninum* tachyzoites. *Parasitology* 1997;115 (Pt 4):371-80.
115. Romand S, Thulliez P, Dubey JP. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol Res* 1998;84(1):50-3.
116. Baszler TV, Adams S, Vander-Schalie J, Mathison BA, Kostovic M. 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* 2001;39(11):3851-7.
117. Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *J Vet Diagn Invest* 1995;7(2):273-5.

118. Wapenaar W, Barkema HW, Vanleeuwen JA, McClure JT, O'Handley RM, Kwok OC, et al. Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle. *Vet Parasitol* 2007;143(2):166-73.
119. Ho MS, Barr BC, Rowe JD, Anderson ML, Sverlow KW, Packham A, et al. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J Parasitol* 1997;83(3):508-14.
120. Baszler TV, Gay LJ, Long MT, Mathison BA. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J Clin Microbiol* 1999;37(12):4059-64.
121. van Maanen C, Wouda W, Schares G, von Blumroder D, Conraths FJ, Norton R, et al. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol* 2004;126(4):351-64.
122. Basso W, Venturini MC, Moré G, Quiroga MA, Travería G, Bacigalupe D, et al. Aplicación de PCR para la detección de *Neospora caninum* en fetos bovinos abortados. In: 12º Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario; 2005; Montevideo, Uruguay.; 2005.
123. Kaufmann H, Yamage M, Roditi I, Dobbelaere D, Dubey JP, Holmdahl OJ, et al. Discrimination of *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* and other apicomplexan parasites by hybridization and PCR. *Mol Cell Probes* 1996;10(4):289-97.
124. Muller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J Clin Microbiol* 1996;34(11):2850-2.
125. Yamage M, Flechtner O, Gottstein B. *Neospora caninum*: specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). *J Parasitol* 1996;82(2):272-9.
126. Harlow E, Lane D. *Antibodies, A Laboratory Manual*. USA; 1988.
127. Ho MSY, Barr BC, Rowe JD, Anderson ML, Sverlow K, Packham AE, et al. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. *J Parasitol* 1997;83(3):508-514.
128. Moré G, Basso W, Bacigalupe D, Venturini MC, Venturini L. Diagnosis of *Sarcocystis cruzi*, *Neospora caninum*, and *Toxoplasma gondii* infections in cattle. *Parasitol Res* 2008;102(4):671-5.
129. Savini G, Dunsmore JD, Robertson ID. Studies on pathogenesis, tissue infection and congenital transmission in cows experimentally infected with *Sarcocystis cruzi* by various routes. *Vet Parasitol* 1996;64(4):319-27.
130. Davison HC, Otter A, Trees AJ. Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. *Int J Parasitol* 1999;29(10):1683-9.
131. Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J Parasitol* 1997;83(3):545-7.
132. Bartels CJ, Huinink I, Beiboer ML, van Schaik G, Wouda W, Dijkstra T, et al. Quantification of vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* infection in Dutch dairy herds. *Vet Parasitol* 2007;148(2):83-92.

133. Hemphill A, Gottstein B. A European perspective on *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2000;30(8):877-924.
134. Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J Parasitol* 1997;83(1):82-7.
135. Björkman C, McAllister MM, Frossling J, Naslund K, Leung F, Uggla A. 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* 2003;15(1):3-7.
136. Barling KS, Lunt DK, Snowden KF, Thompson JA. Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers. *J Am Vet Med Assoc* 2001;219(9):1259-62.
137. Barling KS, McNeill JW, Thompson JA, Paschal JC, McCollum FT, 3rd, Craig TM, et al. Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *J Am Vet Med Assoc* 2000;217(9):1356-60.
138. Piergili Fioretti D, Rosignoli L, Ricci G, Moretti A, Pasquali P, Polidori GA. *Neospora caninum* infection in a clinically healthy calf: parasitological study and serological follow-up. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000;47(1):47-53.
139. Bergeron N, Fecteau G, Pare J, Martineau R, Villeneuve A. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Quebec. *Can Vet J* 2000;41(6):464-7.
140. Moore DP, Campero CM, Odeon AC, Posso MA, Cano D, Leunda MR, et al. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet Parasitol* 2002;107(4):303-16.
141. Slotved HC, Jensen L, Lind P. Comparison of the IFAT and Iscom-ELISA response in bovine foetuses with *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol* 1999;29(8):1165-74.
142. Jenkins M, Baszler T, Bjorkman C, Schares G, Williams D. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int J Parasitol* 2002;32(5):631-6.
143. Savini G, Robertson ID, Dunsmore JD. Viability of the sporocysts of *Sarcocystis cruzi* after exposure to different temperatures and relative humidities. *Vet Parasitol* 1996;67(3-4):153-60.

Fotografías



Foto 1: Observación en fresco de un quiste de *S. cruzi*. 20X

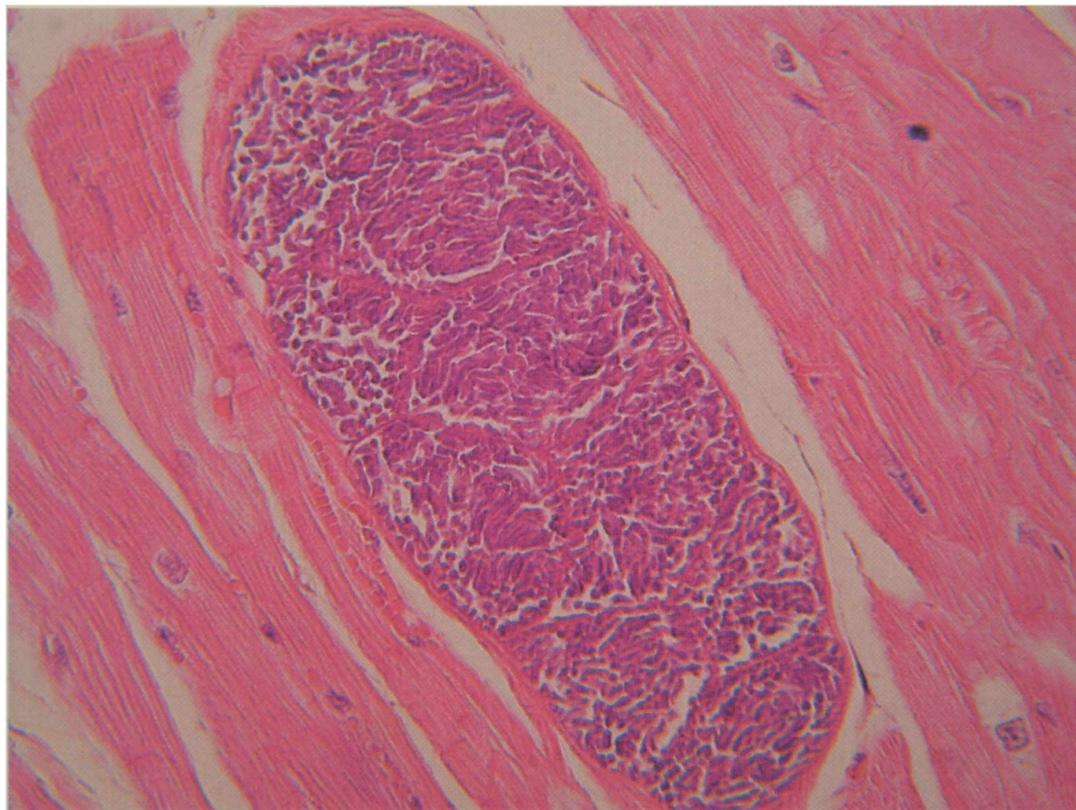


Foto 2: Quiste de *Sarcocystis cruzi* en músculo cardíaco H&E, 40 X.

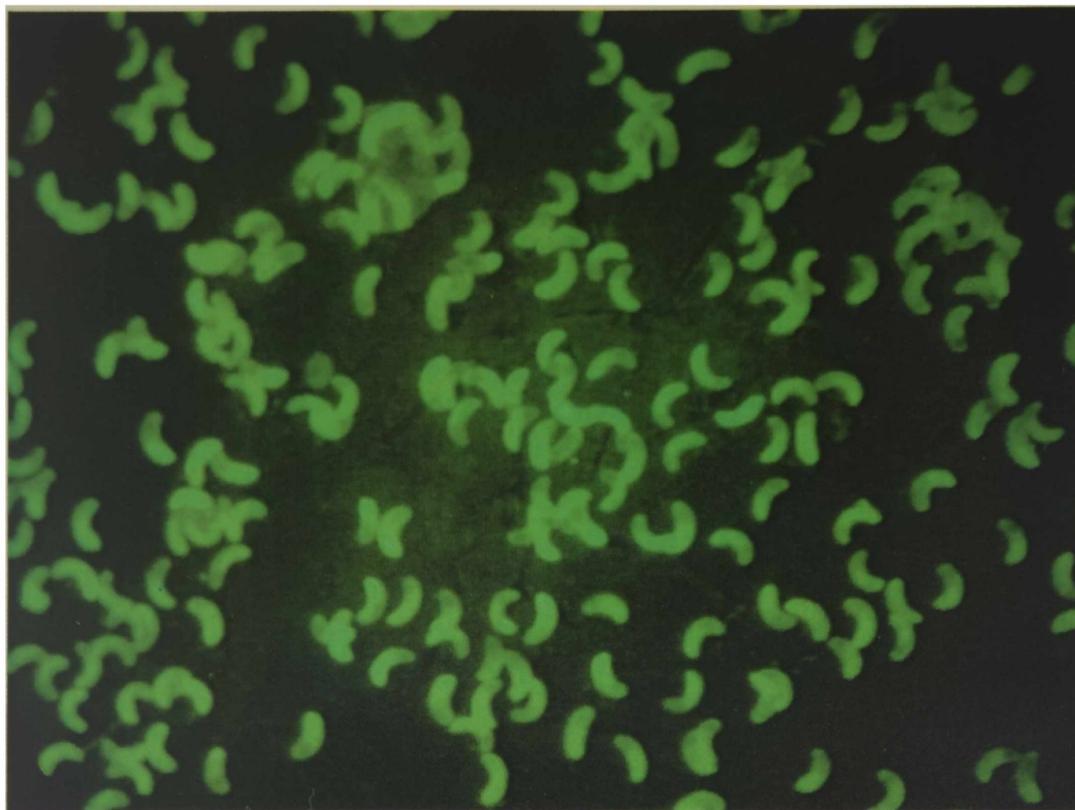


Foto 3: IFI con antígeno de *S. cruzi*, 20X.

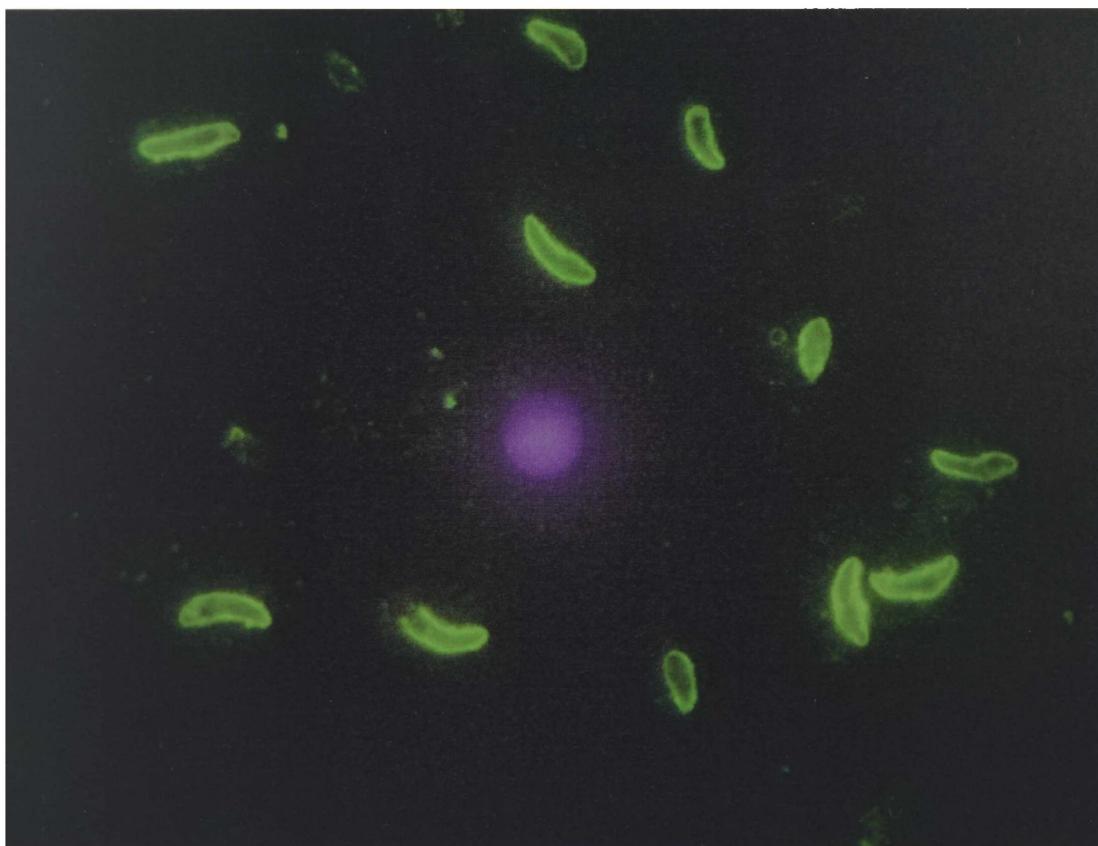


Foto 4: IFI con antígeno de *N. caninum*, 100X.



Foto 5: Extracción de sangre por punción yugular en un ternero, previa ingestión de calostro.

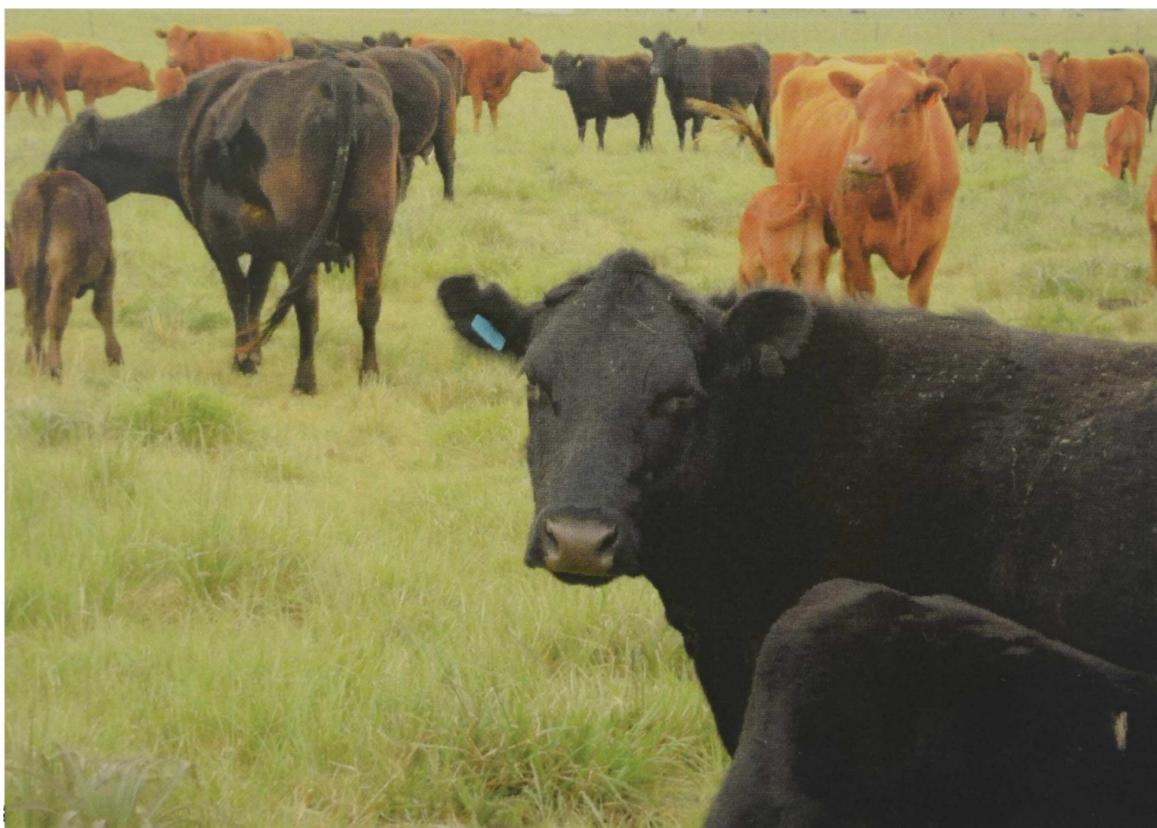


Foto 6: rodeo de cría del partido de Las Flores.

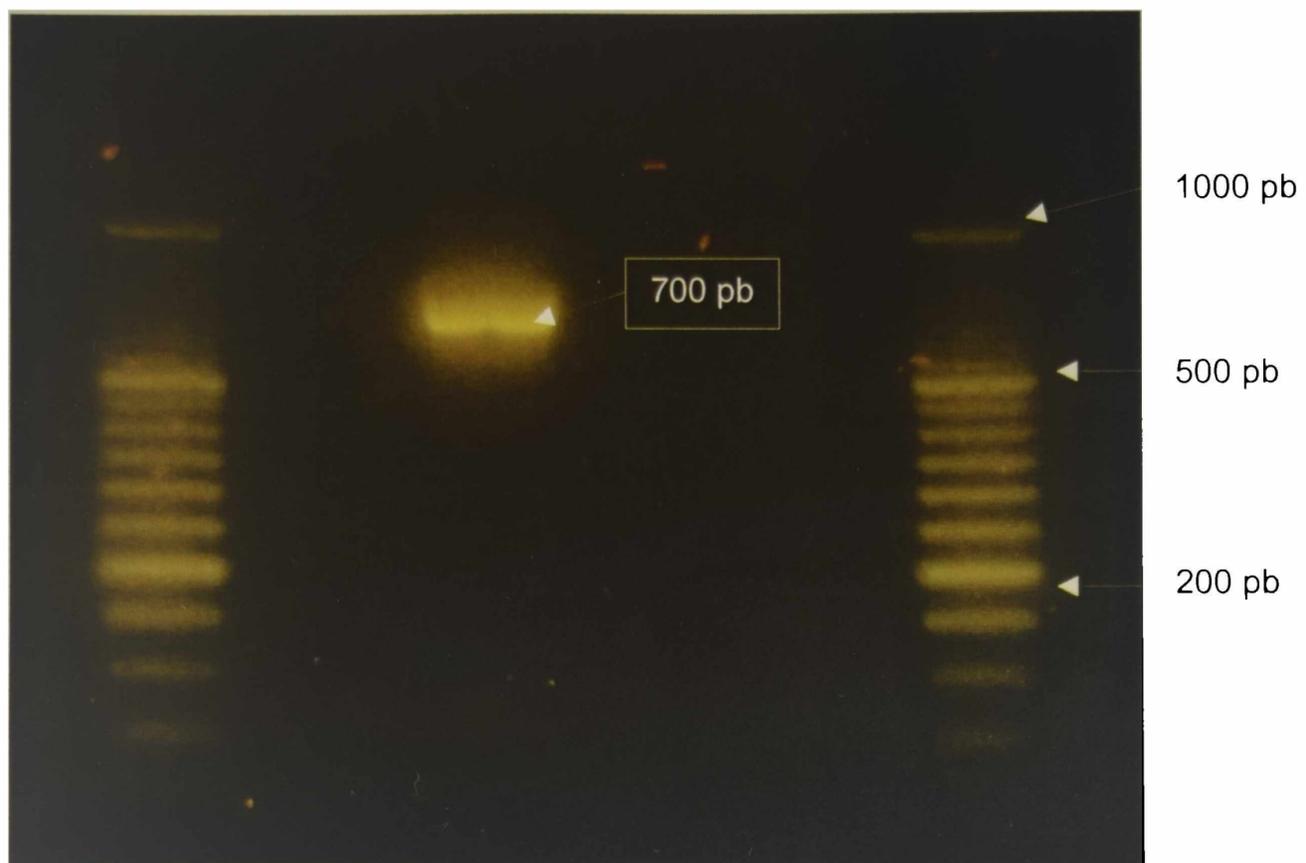


Foto 7: resultado de PCR para *Sarcocystis* sp, la banda específica es de aproximadamente 700 pb. Tinción con bromuro de etidio y observación en transiluminador UV.

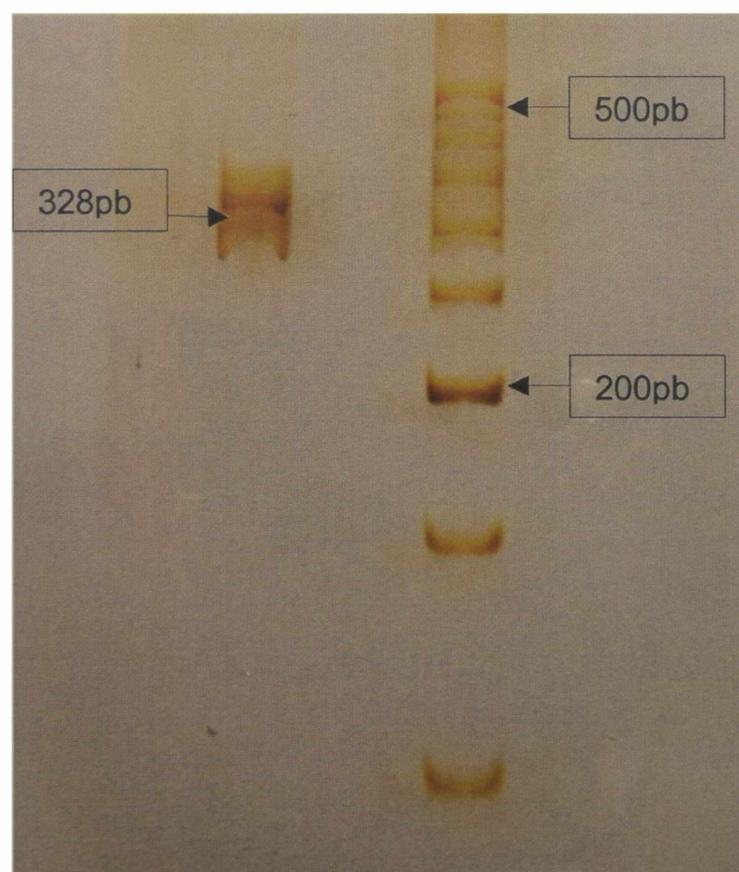


Foto 8: resultado positivo de PCR para *N. caninum*. El amplificado específico es de 328 pb. Tinción con nitrato de plata.