



**Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias
Especialización en diagnóstico de laboratorio veterinario**

**TRABAJO FINAL INTEGRADOR
Plan de Trabajo**

ALUMNO: Med. Vet. Gerardo José Fernández

DIRECTOR: Dr. Jorge Romero

TÍTULO:

ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum* EN SUEROS DE RODEOS BOVINOS DE LA ZONA SUR DE MENDOZA.

OBJETIVO:

Obtener datos sobre la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en hembras bovinas en edad reproductiva de los rodeos de la zona Sur de la provincia de Mendoza.

OBJETIVO ESPECIFICOS:

1. Detectar anticuerpos contra *Neospora caninum* utilizando la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta en la población de hembras bovinas del sur de Mendoza.
2. Transferir la metodología de la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* al Laboratorio de la Fundación Coprosamen.

INTRODUCCIÓN:

Neospora caninum es un protozoario del phylum Apicomplexa, familia Sarcocystidae, clase Sporozoa, orden Eucoccida, familia Sarcocystidae, subfamilia Toxoplasmatinae (Basso W. y col., 2001).

La neosporosis fue descrita por primera vez en Noruega en el año 1984 como una encefalitis y miositis de los perros causada por un esporozoo no identificado (Bjerkas y col., 1984). En 1988 Dubey y col. aislaron y describieron a su agente causal, denominándolo *Neospora caninum* (Campero C., 2014). Fue aislado de bovinos en California, si bien durante algún tiempo se discutió si los parásitos provenientes de perros y de bovinos eran similares, se coincidió posteriormente en su semejanza estructural y antigénica (Conrad y col., 1993).

Una de las vías de transmisión, es la vertical o transplacentaria. Según la etapa de la gestación en que se produce la infección, ésta podrá resultar en un aborto, muerte perinatal o en el nacimiento de un ternero infectado (Williams y col., 2000), lo que condicionará la permanencia de la infección en el rodeo. La otra vía de transmisión es la horizontal o post-natal. En 1998 se comprobó en forma experimental, que el perro

podía actuar como hospedador definitivo de *Neospora caninum* (McAllister y col., 1998). En 2001 se describió el primer aislamiento de *Neospora caninum* a partir de ooquistes hallados en heces de un perro naturalmente infectado (Basso y col., 2001). La cepa aislada se identificó como Nc-6 Argentina, sobre la base de su estructura, antigenicidad y características moleculares. También se ha comprobado que los perros pueden infectarse mediante la ingestión de placentas de animales infectados, que probablemente vehiculen taquizoítos o quistes de *Neospora caninum* (Dijkstra y col., 2001).

En bovinos, un aborto por *Neospora caninum* puede ocurrir como consecuencia de: un desafío primario de ooquistes en una hembra preñada (vía transplacentaria exógena) o la reactivación de la infección preexistente vía transplacentaria endógena (Dubey y col. 2006).

Que la preñez termine en un aborto depende del período de la gestación en que se produjo la infección fetal y de la inmunocompetencia del feto, ya que cuando más tardíamente se produce la infección, son mayores las probabilidades de que nazca un ternero clínicamente sano, pero congénitamente infectado. Las vacas que abortaron pueden abortar en las siguientes gestaciones pero en algunos estudios se ha observado que en sucesivas pariciones puede disminuir la tasa de transmisión transplacentaria. Esta última es variable entre el 50 al 95%.

La neosporosis es reconocida como una importante causa de abortos en bovinos lecheros en distintos países del mundo. En Argentina, se detectó el parásito en bovinos por primera vez en 1995 (Venturini L. y col. 1995) a partir de colecciones de sueros de vacas abortadas. En 1999 se describió la transmisión transplacentaria, siendo la prevalencia en fetos del 24,4% y del 64,5% en vacas lecheras con antecedentes de abortos (Moore y col. 2002).

El parásito fue identificado por inmunohistoquímica en fetos abortados (Campero y col., 1998). En un estudio realizado por Moore y col. 2002, la seroprevalencia en hembras con problemas reproductivos fue del 43,1% en vacas lecheras y del 18,9% en

hembras de carne. En hembras sin problemas reproductivos la seroprevalencia fue del 16,6% y del 4,7% respectivamente (Moore y col. 2005).

En reportes actualizados de las pérdidas económicas, los resultados instan a trabajar en forma rápida y eficiente en el tema; algunos de estos reportes son: A nivel mundial dichas pérdidas fueron estimadas desde un billón de US\$ anuales hasta 2,4 billones.

En nuestro país, recientes estimaciones de referencia determinaron que las pérdidas económicas anuales en dólares estadounidenses llegan a los 56,5 millones. Para dicho cálculo, se consideró la población total de hembras bovinas lecheras o para carne en riesgo potencial (1,7 y 9,7 millones de cabezas, respectivamente). Un 8% de esas hembras lecheras pueden sufrir abortos por distintas causas y un 16,5% de esa proporción pueden deberse a *Neospora caninum*. Es difícil establecer un valor cierto de costo por un aborto, pero es cierto que en nuestro medio no hay prácticamente descarte de vaquillonas lecheras, por la demanda de reposición siempre insatisfecha de los sistemas, cada vez más intensivos. El valor de la pérdida de una ternera se proyecta fácilmente al valor de la vaquillona de reposición que es el de una lactancia, que supera fácilmente los US\$ 1000. A eso debe agregarse la pérdida en término de retraso del inicio de una lactancia toda vez que luego de un aborto pasan no menos de 3 meses en reiniciar, con suerte una nueva gestación. El costo por aborto se ha estimado en US\$ 1.865 con una pérdida total de US\$ 43.607.430 para la industria láctea en la pampa húmeda (Campero, 2014).

En ganado para carne un aborto implica la pérdida de un año completo para una vaca de cría, el riesgo de aborto se estimó en 4,5%, mientras que 6,7% de esa proporción sería específicamente por *Neospora caninum* con una pérdida estimada en US\$ 440 por aborto, siendo la pérdida anual de US\$ 12.903.440 millones (Bjerkas y col. 1984).

CICLO BIOLÓGICO:

El conocimiento del ciclo biológico de *Neospora caninum* se ha completado a partir de la confirmación del perro como hospedador definitivo en 1998. Sin embargo, aún persisten interrogantes para cada una de sus etapas.

Neospora tiene formas invasivas de división rápida, los taquizoítos, formas de multiplicación lenta capaces de persistir durante años dentro de los quistes tisulares, los bradizoítos, y formas de resistencia como producto de la multiplicación sexual, los esporozoítos, contenidos en los ooquistes esporulados. En el perro los bradizoítos dentro de los quistes tisulares (ejemplo, sistema nervioso central (SNC) de fetos) invaden células del intestino, y se convierten rápidamente en taquizoítos. Estos se multiplican asexualmente en forma repetida mediante endodiogenia. Esta es una forma especializada de reproducción mediante la cual dos células hijas se forman dentro del parásito progenitor. Después de algunos ciclos de división asexual, se produce en los enterocitos la multiplicación sexual que finaliza con formación de ooquistes que son liberados con la materia fecal al medio ambiente. La infección en los bovinos se inicia por la ingestión de alimentos y agua contaminados por ooquistes esporulados. En el intestino del bovino, los esporozoitos abandonan los ooquistes, invaden los enterocitos y se diseminan para invadir y multiplicarse en células de distinto origen embrionario, formando acúmulos de taquizoítos, que las destruyen. Estos zoítos libres invaden células cercanas y reinician su multiplicación y forman los quistes tisulares. En las vacas gestantes, los taquizoítos se localizan en el útero y la placenta e infectan al feto (Infección congénita). El perro se infectaría cuando ingiere tejidos fetales, placentas u órganos de bovinos y de otras especies infectadas con *Neospora caninum* (Moore y col. 2005).

El rol del perro y el zorro será el siguiente: Sin duda que el perro es un factor de riesgo por ser el huesped definitivo y la otra parte importante en la cadena epidemiológica de la neosporosis bovina es el medio ambiente, porque los ooquistes para ser infectantes deben ser esporulados y para esto requieren el medio apropiado. Usualmente el perro y otros cánidos se infectan consumiendo carne de bovino infectado e inician la eliminación de ooquistes aproximadamente una semana después. El número de ooquistes producidos y eliminados por el perro es variable dependiendo de la carga parasitaria que haya tenido el tejido del bovino infectado, sin embargo, en condiciones experimentales se observó que los perros eliminaban mayor cantidad de ooquistes al ingerir tejidos de ratones experimentalmente infectados. Los ooquistes para ser infectantes deben estar esporulados, lo cual ocurre luego de varias horas de

exposición al medio. Un trabajo coproparasitológico de relevancia realizado en Alemania comprobó que la concentración de ooquistes de *Neospora caninum* eliminados por las heces de perros en una muestra son muy variables pudiendo estar en el rango de solo 7 hasta más de 24.000 por muestra. Los cachorros producen mayor cantidad de ooquistes que los adultos y luego de la primo infección, existe un período en el cual los perros resultaron refractarios a la eliminación de los mismos por heces durante 8 a 18 meses.

Los perros no siempre seroconvierten durante la infección incluso, pueden volver al estatus de seronegativo a pesar de eliminar ooquistes en sus heces.

Desde los primeros estudios (Dubey y col. 1988), se han implicado los zorros (*Vulpes vulpes*) como potenciales hospedadores definitivos y un factor de riesgo para *Neospora caninum* asociándolos a la infección/abortos en el bovino. Aunque quedan aún puntos por resolver sobre el ciclo de vida completo, está definido que los cánidos son los hospedadores definitivos, (McAllister y col. 1998, Lindsay y col. 1999, Basso y col. 2001), En realidad los perros actuarían como hospedadores intermediarios y definitivos de *Neospora caninum*. En estudios recientes se confirmó que el coyote (*Canis latrans*), los zorros colorados (*Vulpes vulpes*), el dingo australiano (*C. lupus dingo*) y los lobos grises (*C. lupus lupus*), también actúan como hospedadores definitivos (Gondim y col. 2004, Wapenaar y col. 2006, King y col. 2010, Dubey y col. 2011, Almería 2013, Dubey y col. 2014).

SITUACIÓN PRODUCTIVA – ECONÓMICA EN LA REGIÓN:

Aplicando el criterio citado anteriormente en cuanto a las pérdidas económicas en la Rep. Argentina, podemos inferir los costos de las pérdidas en la zona en estudio; obteniendo los datos del SENASA de la Campaña de Vacunación de Aftosa (SENASA 2014), de la Dirección de Ganadería de la provincia de Mendoza y Cluster Ganadero Bovino Mendoza; se vacunaron en la provincia alrededor de 240.000 mil hembras bovinas en riesgo potencial, donde en la zona en estudio encontramos 168.000 mil (70%), de las cuales 7.560 (4,5%) hembras se producirían abortos por diferentes

causas, donde unas 507 (6,7%) hembras abortarán por causa de *Neospora caninum*, con un costo por cada aborto de US\$ 440 sumariamos US\$ 223.080.

Ahora orientaremos a los lectores, con respecto a los métodos de manejo de los rodeos de cría; nos encontramos en una zona semiárida, con establecimientos de grandes extensiones; con pasturas naturales, aguas de baja calidad y altas temperaturas; donde las lluvias son primavera-estivales.

En los rodeos de la zona se incorporan vientres de dos formas; en la primera los vientres son adquiridos a terceros (los cuales pueden ser de la misma provincia de Mendoza o de otras provincias como Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, La Pampa y San Luis) y en el otro caso se realizan recría en el propio establecimiento (en los cuales se dejan las hembras nuevas solas con las mejores pasturas en cuadros alejados de los toros, para que las mismas se puedan desarrollar bien antes de entrar a servicio); dentro de este manejo hay establecimientos que realizan una actividad productiva de forma sistemática u ocasional (cuando hay pocas pasturas naturales en el campo) se llevan las terneras a criar a fincas (son extensiones con potreros implantados artificialmente que se riegan por canales, se conocen también como establecimientos Bajo Riego y estos se encuentran cercanos a los poblados, en esta zona tenemos las cuencas de los Río Diamante y Río Atuel).Es en este tipo de explotación donde tendríamos similitudes de cargas con la pampa húmeda, mayor cantidad de perros en contacto con las terneras de recría por la cercanía de los centros poblados, en los establecimientos ganaderos también se encuentran en aumento las poblaciones caninas de origen doméstico, salvaje (cimarrón) y zorros; por lo que se está en presencia de los hospedadores que ponen en riesgo de infección horizontal. Por estas coincidencias se esperaría tener estadísticas de hembras con anticuerpos muy similares a los obtenidos en otros estudios en nuestro país.

MATERIALES Y METODOS

DESARROLLO:

Recolección y mantenimiento de los sueros de lotes de vacas.

Se utilizaron sueros de lotes de vacas recolectados por el Laboratorio de la Fundación Coprosamen de los sangrados realizados durante el periodo julio 2014 a mayo 2015 (200 sueros) y mayo 2017 (70 sueros); los sueros se eligieron por las características de calidad que son exigidos por el SENASA y se los almacenó en freezer a - 20° C. Se seleccionaron 10 sueros por cada uno del total de los 27 establecimientos de la zona sur de la provincia de Mendoza, a los que se les realizó el diagnóstico de Brucelosis Bovina, siendo el resultado negativo en todos los sueros; la elección de los establecimientos fue al azar.

Se trabajó inicialmente en una dilución de 1/100, y a los sueros que resultaron positivos se les realizó la dilución a 1/200. En las situaciones en que los sueros nos dieron positivo en 1/200, se les realizó otra dilución de 1/400, a los sueros positivos se les realizó la dilución de 1/800.

Se procesaron los primeros 20 establecimientos en el Laboratorio CEDIVE, en el mes de abril de 2017. Los sueros se habían mantenido congelados en freezer a -20°C varios meses. Los sueros de los otros 7 establecimientos fueron recolectados en el mes de mayo de 2017, pero no se congelaron, sino que procesaron inmediatamente luego de mantenerse no más de 5 días a 7°C.

Estudios de laboratorio:

a) Materiales:

- Sueros bovinos de vacas y vaquillonas (N: 270).
- Se utilizó antígeno específico, consistente en taquizoítos, fijados en portaobjetos para IFI, provistos por el laboratorio de Inmunoparasitología, de la FCV. UNLP.
- Conjugado anti IgG. Bovino marcado con Isotiocianato de Fluoresceína (Sigma F7887).
- Solución buffer de fosfatos (PBS): Sol. madre (cloruro de sodio 40 gr, cloruro de potasio 1 gr, fosfato sódico dibásico 5,75 gr, fosfato de potasio monobásico 1 gr y

agua destilada csp 500ml); Sol. de trabajo: se diluye sol. madre en agua destilada en una proporción de 1: 10. El pH final es de 7,2.

- Solución buffer de carbonatos (Rinse buffer): Sol. madre (Carbonato de sodio 11.4 gr, Bicarbonato de sodio 33,6 gr, Cloruro de sodio 8,5 gr y Agua destilada csp 1 litro, pH 9); Sol. de trabajo: se diluye sol. madre en agua destilada en una proporción de 1:4.
- Solución fisiológica (CL Na).
- Agua destilada.
- Glicerol.

Materiales varios

- Micropipetas volúmenes fijos y variables, placas para dilución y otros materiales de laboratorio, como: gradillas y cajitas para portas de telgopor, tips, recipientes para descartar los mismos, lavandina, rejillas para desinfectar las mesadas, ect.
- Microscopio marca NIKON L 200, con lámpara de IF de 100 watt de potencia.

b) Técnica de IFI:

Se siguió el protocolo de trabajo de los manuales del Laboratorio de Inmunoparasitología, y del CEDIVE. FCV, UNLP (Manual Inmunodiagnóstico y Soluciones Técnicas y Diagnósticas, 2012).

Prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para *Neospora caninum*.

1. Diluciones de los sueros.

Sueros problema y controles: realizar las diluciones correspondientes en PBS.

- Antes de iniciar la prueba dejar secar los portaobjetos a utilizar.
- Usar una placa de 96 pocillos para realizar las diluciones.
- Colocar cantidades constantes de PBS (solución de trabajo), 100 µl en todos los pocillos excepto en el primero.
- Colocar 8 µl de suero en 192 µl de PBS en el 1er pocillo (Dilución 1:25).
- Realizar las diluciones siguientes pasando 100 µl desde el primer pocillo en adelante, homogeneizando cuidadosamente en cada pasaje.

- Colocar las diluciones en el portaobjeto.
- Colocar sueros controles positivos y negativos.

2. Procedimiento:

- Incubar el antígeno con el suero problema a 37° C durante 30 minutos en cámara húmeda.
- Realizar un lavado de 10 minutos con buffer de carbonatos (de solución de trabajo), pH 9 (*Neospora caninum*), en agitador.
- Incubar con el conjugado correspondiente, 30 minutos a 37° C, en cámara húmeda.
- Lavar con buffer de carbonatos durante 10 minutos y con agitación.
- Montar con glicerina al 50 % en buffer de carbonatos.
- Observar con microscopio de fluorescencia.

Las muestras se procesaron con el siguiente criterio de títulos a evaluar a partir de una dilución 1/100. A los sueros que resultaron positivos se les realizó la dilución de 1/200, y en los casos positivos, se les realizó otra dilución de 1/400, y 1/800 como título final.

Diagrama de las diluciones realizadas:



3. Interpretación de resultados:

Se consideró la última dilución del suero en la cual se observe fluorescencia completa en todo el contorno del parásito, interpretando como positivo a partir de la dilución 1/200.

RESULTADOS:

Sólo 2 individuos en dos establecimientos diferentes resultaron positivos en una dilución de 1/200 o superior a anticuerpos contra *Neospora caninum*, entre los 200

sueros que se procesaron en el CEDIVE, resultando una prevalencia muy inferior a la esperada. En cuanto a los 70 sueros procesados frescos (10 por cada establecimiento) en el Laboratorio de la Fundación COPROSAMEN, se obtuvieron 5 casos con anticuerpos y con título de individuos reaccionantes positivos a *Neospora caninum*. La distribución en los establecimientos fue amplia (uno en cada uno de 5 establecimientos), resultando solo 2 establecimientos sin individuos reaccionantes, de un total de siete.

DISCUSION Y CONCLUSIONES:

Los resultados obtenidos en los 270 sueros (27 establecimientos) fue de 7 sueros positivos (7 establecimientos), esto nos daría un porcentaje de 1,85 % de los sueros procesados, y una prevalencia aparente del 25,9% en establecimientos.

De considerarse solo las muestras procesadas con sueros frescos la prevalencia resultaría de 5 establecimientos de cada 7 (71,4%) y una general en animales de 5 cada 70 (7,1%).

Si bien las diferencias entre las dos series muestreadas, podrían atribuirse a problemas de conservación de la primera, la prevalencia aparente en animales resulta en general, más baja que otras zonas del país.

La baja prevalencia de la infección en animales de la zona estudiada podría estar asociada a lo extensivo de las explotaciones en las que las tasas de contacto para transmisiones horizontales son bajas.

Si bien estos resultados deben considerarse absolutamente preliminares, podría inferirse que resultaría interesante ampliar los muestreos utilizando sueros frescos, y ampliando el número de muestras por establecimiento, para mejorar la expectativa de hallazgo sobre hipótesis de baja prevalencia individual

BIBLIOGRAFÍA:

1. -Basso W., Venturini L, Venturini MC, Hill DE, (2001). First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. *Journal of Parasitology*: Vol. 87, No. 3, pp. 612-618.
2. -Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, vol. 70, no. 2, pp. 271–274.
3. -Campero Carlos (2014), Opciones para el control de la Neosporosis Bovina, MV, DVM, PhD. *Rev. Taurus* 16 (63): 4-15.
4. -Conrad PA, Barr BC, Sverlow KW, Anderson M, Daft B, Kinde H, Dubey JP, Munson L., Ardans A, (1993). *in vitro* isolation and characterization of a *Neospora* sp. From aborted bovine fetuses. *Parasitology*.106: 239-249.
5. -Williams, D.J., Guy, C.S., McGarry, J.W., Guy, F., Tasker, L., Smith, R.F.,vMacEachern, K., Cripps, P.J., Kelly, D.F., Trees, A.J. (2000). *Neospora caninum*-associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitology* 121: 347-358.
6. -McAllister, M. M., Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A.,McGuire, A. M. (1998).Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, vol.28, no. 9, pp. 1473–1478.
7. -Dijkstra Th., Eysker M., Schares G., Conraths F.J., Wouda W., Barkema H.W..(2001). Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachizoytes. *International Journal for Parasitology*, vol. 31, no 8, pp. 747–752, 2001.
8. -Dubey, J.P. and Schares, G. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. *Veterinary Parasitology*, vol. 140, no. 1-2, pp. 1–34.
9. -Venturini L., Di Lorenzo C., Venturini C., Romero J (1995) Anticuerpos anti *Neospora* sp. en vacas que abortaron. *Vet. Arg.* XII, 113. 12, 167–170.

10. -Venturini, M.C., Venturini, L., Bacigalupe, D., Machuca, M., Echaide, I., Unzaga, J.M., Di Lorenzo, C., Guglielmone, A., Dubey, J. P. (1999). *Neospora caninum* infections In bovine fetuses and dairy cows with abortions in Argentina. *International Journal for Parasitology*. 29, 1705–1708.
11. -Moore DP, Campero CM, Odeón AC, Poso MA, Cano D, Leunda MR, et al. (2002) Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet. Parasitol.* 107, 303–316.
12. -Campero, C. M., Anderson, M. L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G., Poso. M. A. (1998). *Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina. *Vet. Rec.* 143, 228-229.
13. -Moore D.P., Odeón A.C., Venturini M.C., Campero C.M. (2005), Neosporosis bovina: Conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación *Rev. argent. microbiol.* v.37 n.4 Ciudad Autónoma de Buenos Aires oct./dic. 2005.
14. -Dubey JP., Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Med. Assoc.*, 192:1259-1263.
15. -McAllister MM.; Dubey JP.; Lindsay D.; Jolley WR.; Wills RA.; McGuire AM. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, vol. 28, no. 9, pp. 1473–1478.
16. -Lindsay D.; Dubey JP.; Duncan R. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*, vol. 82, no. 4, pp. 327–333.
17. -Gondim LFP.; McAllister MM.; Pitt WC.; Zemlicka DE. (2004). Coyotes (*Canis latrans*) are definitive host of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, vol. 34, no. 2, pp. 159–161.
18. -Wapenaar W.; Jenkins MC.; O’Handley RM.; Barkema HW. (2006). *Neospora caninum* like oocysts observed in feces of free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) and coyotes (*Canis latrans*). *Journal of Parasitology*, vol. 92, no. 6, pp. 1270–1274.

19. -King JS.; Slapeta J.; Jenkins DJ.; Al-Qassab SE.; Ellis JT.; Windsor PA. (2010). Australiandingos are definitive host of *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology, vol. 40, no. 8, pp. 945–950.
20. -Almería S. (2013). *Neospora caninum* and wildlife. ISRN Parasitology 1-23. <http://dx.doi.org/10.5402/2013/947347>.
21. -Dirección de Ganadería de la Provincia de Mendoza (2014)- Datos estadísticos de Cluster Ganadero de Mendoza, <http://www.clusterganaderobovino.net/>.
22. -Dubey JP., Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. (1988). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. J. Am. Med. Assoc., 192:1259-1263.

Manuales de referencia consultados:

- Manual de Inmunodiagnóstico Curso de Inmunoparasitología, Carrera de especialista en laboratorio de diagnóstico veterinario FCV- UNLP (2012).
- Soluciones y Técnicas de Diagnóstico, FCV-UNLP (2012).
- Neosporosis: Inmunidad y diagnóstico. Dra. M.C. Venturini y Dra. L. Venturini Miscelanea. Curso.