



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

“DETECCIÓN DE *Neospora caninum* EN FETOS
ABORTADOS EN BOVINOS LECHEROS
DE HUACHO Y CAÑETE”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO
EN PARASITOLOGÍA EN ANIMALES
DOMÉSTICOS Y SILVESTRES

Alessandra Ivette Matienzo Bernabé

LIMA - PERÚ

2019

ASESOR DE TESIS

Marcos Enrique Serrano Martínez

Médico Veterinario, Magíster, Doctor en Ciencias Veterinarias

Docente Asociado-Investigador

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Peruana Cayetano Heredia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Serrano y al Dr. Luis Llanco, por la oportunidad, paciencia y las enseñanzas en todo el proceso de desarrollo.

A mis padres, por su apoyo constante y su amor incondicional en cada momento de mi vida.

A mi hermano Renzo, por su cariño y enseñanzas.

A Luis por su paciencia en esta etapa, apoyo y su gran amor.

A mis grandes amigos que hice en el transcurso de esta etapa (Adhemir, Cleila y André) por su gran apoyo y amistad.

A mi querida amiga Rosa Luz que sin ella no sabría cómo reír tanto.

Fuentes de Financiamiento

El presente estudio se encuentra financiado por el FINCyT como Tesis de Postgrado del Proyecto de Investigación: “Obtención y caracterización del primer aislado de *Neospora caninum* causante de abortos y mortalidad neonatal en la producción bovina lechera del Perú, con fines inmunodiagnóstico y vacunal.” Con código de proyecto: PIAP-3-P-945-14.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	13
4. OBJETIVO.....	14
4.1 Objetivo General	
4.2 Objetivos específicos	
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Lugar de estudio	
5.2 Diseño del estudio	
5.3 Población de estudio	
5.4 Tamaño de muestra	
5.5 Criterios de inclusión	
5.6 Criterios de exclusión	
5.7 Consideraciones éticas	
5.8 Colección de muestras	

5.9 Procesamiento de muestras.

5.9.1 Extracción de ADN

5.9.2 Cuantificación del ADN extraído

5.9.3 Detección de *N. caninum* mediante nested-PCR

5.9.4 Electroforesis en gel de agarosa

5.10 Análisis estadístico

5.11 Eliminación de las muestras

6. RESULTADOS.....	23
7. DISCUSIÓN.....	31
8. CONCLUSIONES.....	37
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE CUADROS Y TABLAS

Tabla 1. Distribución de datos de las progenitoras de los fetos abortados recolectados de manera espontánea relacionados con la presencia a *N. caninum*.

Tabla 2. Distribución de fetos abortados de bovinos lecheros positivos a *N. caninum* por las técnica de PCR, según la región de procedencia (2016-2017).

Tabla 3. Distribución de fetos abortados de bovinos lecheros positivos a *N. caninum* por la técnica de PCR, según el sexo y edad. (2016-2017)

Tabla 4. Distribución de fetos abortados positivos a *N. caninum* mediante PCR según el órgano de ubicación (2016-2017).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de *N. caninum*

Figura 2. Presentación de casos positivos según la seroprevalencia en el Perú de *N. caninum*.

Figura 3. Resultados del PCR para *Neospora caninum* en muestras de fetos abortados.

GLOSARIO

ADN : Acido desoxirribonucleico

Bp : Pares de bases

BVD : Diarrea viral bovina

dNTPs : Desoxirribonucleótidos trifosfato

IBR : Rinotraqueitis infecciosa bovina

ITS : Espaciador transcrito interno

PCR : Reacción en Cadena de la Polimerasa

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Agraria

RESUMEN

Neospora caninum es un parásito protozoo que se caracteriza por producir una alta tasa de mortalidad neonatal y abortos en el tercio medio de la gestación causante de importantes pérdidas económicas en la producción bovina lechera, manteniéndose como una de las más importantes en el sector ganadero. En el Perú, se han observado escasas investigaciones relacionadas con la presencia del parásito en fetos abortados. Por ello, el objetivo del estudio fue identificar molecularmente *Neospora caninum* como agente etiológico presente en fetos abortados de bovinos de establos lecheros mediante la utilización de la técnica de PCR (reacción de la cadena de la polimerasa). Con este propósito se colectaron 40 fetos abortados provenientes de dos establos ubicados en Cañete (n= 21) y Huacho (n=19), también se levantó información epidemiológica de la edad, sexo y procedencia. A la necropsia de cada feto se colectó cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñones, timo, bazo, médula espinal, glándula adrenal, intestino delgado con placas de Peyer y se realizó la extracción de ADN de cada tejido. Se identificó la presencia de ADN de *N. caninum* en el 37.5% (15/40) de las muestras de fetos abortados, siendo el cerebro el principal órgano con *N. caninum* 100% (15/15). No se observó diferencias significativas en las variables (sexo, edad y procedencia) analizadas en las muestras. Con estos resultados se confirma la presencia de *N. caninum* en fetos abortados de bovinos en establos de Lima.

Palabras clave: Neosporosis, bovino, PCR, aborto.

ABSTRACT

Neospora caninum is a protozoan parasite characterized by producing a high rate of neonatal mortality and abortions in the middle third causing important economic losses in dairy cattle production, remaining one of the main in livestock sector. In Peru, scarce investigations have been observed related to presence of parasite in aborted fetuses. Therefore, objective of this study was to molecular identification of *Neospora caninum* as an etiological agent present in aborted fetuses of dairy cattle by using PCR technique (polymerase chain reaction). Forty aborted fetuses were collected from two stables located in Cañete (n = 21) and Huacho (n = 19), epidemiological information was collected about age, sex, and origin. At necropsy, brain, heart, lung, liver, kidneys, thymus, spleen, spinal cord, adrenal gland, small intestine with Peyer's Plates were collected of each fetus, and the DNA extraction of each tissue was performed. Presence of *N. caninum* DNA was identified in 37.5% (15/40) samples of aborted fetuses, with brain being the main organ with *N. caninum* 100% (15/15). No significant differences were observed in the variables (sex, age and origin) analyzed in samples. With these results, the presence of *N. caninum* is detected in aborted fetuses of cattle in Lima stables.

Key words: Neosporosis, cattle , PCR, abortion

1. INTRODUCCIÓN

Neospora caninum es un parásito Apicomplexa intracelular que causa una enfermedad parasitaria denominada neosporosis. Esta infección se transmite de manera vertical y horizontal, siendo la transmisión madre-cría la forma que predomina (Ellis *et al.*, 1999; Dubey *et al.*, 2017). Sin embargo, la transmisión vertical por sí sola no es suficiente para sostener la infección (Gondim *et al.*, 2004; Reichel *et al.*, 2013). Las consecuencias incluyen aborto, nacimiento de terneros débiles que mueren poco después del nacimiento o nacimiento de terneros clínicamente sanos pero infectados que pueden transmitir dicha infección a su descendencia en gestaciones consecutivas (Gamarra, 2001; Ghalmi *et al.*, 2012).

En nuestro país, falta por conocer sobre los agentes infecciosos que intervienen en las pérdidas embrionarias y fetales. Estudios actuales demuestran la prevalencia de *N. caninum* de vacas lecheras en el valle de Lima, confirmando la presencia de este parásito en el país (Fernández, 2018; Serrano *et al.*, 2018). En Brasil, se analizaron órganos de fetos abortados mediante PCR confirmando la presencia del parásito y determinando un nuevo aislado de *N. caninum* (Dittrich *et al.*, 2018). Otros estudios como el de Van Maanen *et al.* (2004) y Abril *et al.*, (2019) detallan que existe mayor sensibilidad de confirmar neosporosis en fetos mediante técnicas de PCR en comparación a la inmunohistoquímica.

Teniendo en cuenta que en el Perú se han realizado estudios de *Neospora caninum*, hoy en día se sigue sin tomar medidas de prevención o control eficaz tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de esta enfermedad. Las pérdidas productivas y económicas en el ganado se encuentran entre la principal consecuencia de la presencia de *Neospora caninum* siendo considerado mundialmente como uno de los diagnósticos más comunes para casos de aborto de origen infeccioso y muerte fetal (Álvarez *et al.*, 2002; Robayo *et al.* 2017). Por todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *N. caninum* en fetos abortados de bovinos de establos lecheros de Huacho y Cañete mediante el uso del PCR.

2. ANTECEDENTES

Neospora caninum es un parásito coccidia perteneciente al phylum Apicomplexa, que comparte características morfológicas y biológicas similares con *Toxoplasma gondii*, que puede estar presente en animales domésticos como silvestres. (Dubey *et al.*, 2007; Donahoe *et al.*, 2015; Fávero *et al.*, 2017). *Neospora caninum* cuenta con tres estadios parasitarios distintos: los taquizoitos se pueden presentar de forma ovoide, lunar o globular llegando a medir de 3-7 μm de largo y de 1-5 μm de ancho. En cambio, los bradizoitos miden entre 6-8 μm de largo y 1-1.2 μm de ancho. Por otro lado, los ooquistes son de forma esférica, llegando a medir aproximadamente entre 10-12 μm y se encuentra formado de dos esporoquistes con forma elipsoidal y dentro de estos, se encuentran cuatro esporozoitos con forma alargada. Estos ooquistes (no esporulados) son eliminados por medio de las heces de los hospederos definitivos, para luego esporular en el medio ambiente (McAllister *et al.*, 1998; Dubey *et al.*, 2002).

Al consumir tejido contaminado con *Neospora caninum* se produce, dentro del hospedero definitivo, la fase sexual del parásito para luego, al ser eliminados al medio ambiente, estos ooquistes esporularán con el fin de convertirse en infectivos a las 24 horas después de eliminado (McAllister *et al.*, 1998; McAllister 2016) . Al ocurrir la ingesta de los ooquistes infectivos, los hospederos intermediarios desarrollarán la fase asexual del ciclo; asimismo, su transmisión podría presentarse mediante la vía vertical (Dubey, 2003). Al llegar al tracto gastrointestinal, los esporozoitos son liberados y localizados en el interior de los

enterocitos donde se ejecutará la replicación rápida a taquizoitos. Al infectar, estos taquizoitos penetran dentro de la célula por medio de invasión activa, dentro de una vacuola parasitófora (Hemphill *et al.*, 1996) y su división se realiza mediante endodiogenia (Speer *et al.*, 1999). Estos taquizoitos se encargan de la fase aguda de la enfermedad; mientras que, en la fase crónica se observan los bradizoitos (Risco *et al.*, 2014). La replicación de los bradizoitos, contenidos en los quistes tisulares, es lenta y pueden estar presentes en el hospedero definitivo y en el intermediario localizándose sólo en el tejido nervioso; ya sea, cerebro, médula espinal y retina (Dubey *et al.*, 2006). El ciclo culmina cuando el parásito es ingerido por el hospedero definitivo; dando así, la formación de ooquistes (Dubey, 1999a).

Neospora caninum presenta un ciclo biológico heteroxeno facultativo, siendo el hospedero definitivo el perro (*Canis l. familiaris*) y el hospedero intermediario, en esta situación, el bovino (Rondón y Díaz, 2006). Este ciclo presenta dos vías de transmisión (horizontal y transplacentaria). La transmisión transplacentaria juega un papel importante con respecto al modo de diseminación y mantenimiento del parásito (Paré *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1997; de Aquino *et al.*, 2019). Se observa dentro de esta transmisión la vía endógena, en la que se da la reactivación de bradizoitos a taquizoitos; y exógena, donde ocurre una primoinfección o reinfección (McAllister, 2016). Al encontrarse con la enfermedad, los animales suelen permanecer toda la vida con la presencia de este, lo que desencadenaría en la transmisión a su descendencia (Pereira-Bueno *et al.*, 2000). Esto, podría desencadenar el aborto en el segundo o último tercio de gestación o el nacimiento de terneros clínicamente sanos pero congénitamente infectados (Almería *et al.*, 2017).

Otra forma de diseminación es la transmisión horizontal cuya importancia también ha sido demostrada (Llano *et al.*, 2018). Esta se da por medio de la ingestión de material contaminado con ooquistes eliminados mediante las heces del hospedero definitivo, como por ejemplo el agua de bebida y el alimento (Moore, 2005); por lo que, se describió que *N. caninum* tiene ingreso por la vía oro-fecal (McAllister *et al.*, 1998). Figura 1

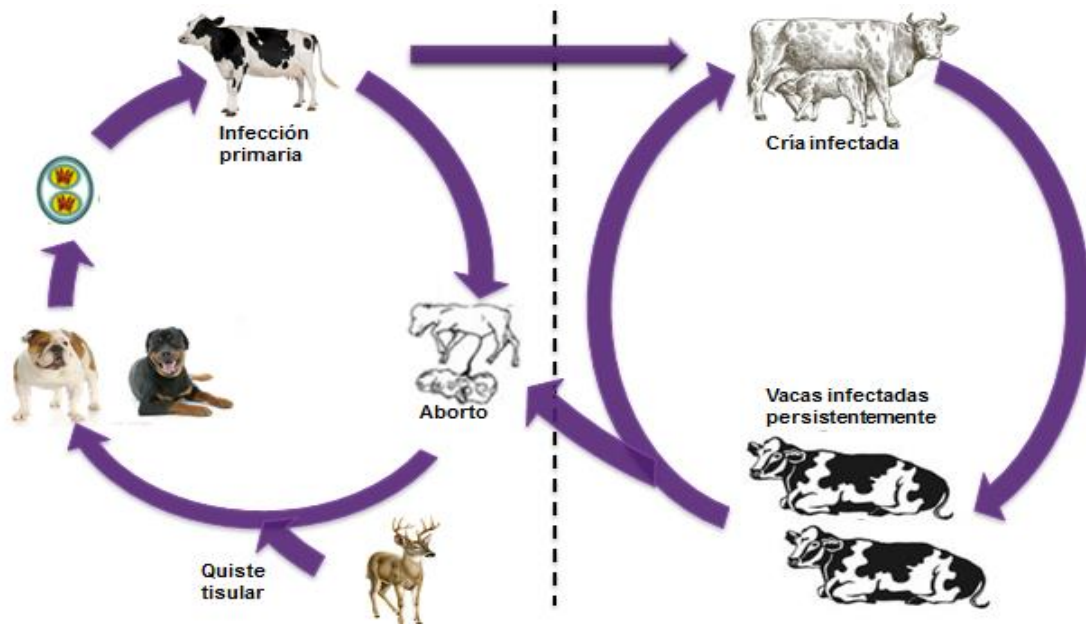


Figura 1. Ciclo biológico de *N. caninum* observando la transmisión horizontal y transplacentaria (endógena y exógena), asimismo la existencia del ciclo silvestre. (Dubey *et al.*, 2017)

En la mayoría de los casos, la presencia de perros en los establos es considerado uno de los factores de riesgo de mayor preocupación (Wouda *et al.*, 1999; Dijkstra *et al.*, 2002); ya que, generalmente, la presencia de estos animales permite el acceso a la ingesta de placenta, fetos o a la contaminación mediante sus heces. Además de esto, otras especies como el coyote, lobo o el zorro gris han sido descritos e identificados como hospederos definitivos en

establos con abortos (Barling *et al.*, 2000; Gondim *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2007; Klein *et al.*, 2019).

Un factor predisponente determinado años atrás fue el tipo de explotación observando mayores casos en establos lecheros y asociándolo al tipo de manejo que se emplea en estos (Anderson *et al.*, 1991; Paré *et al.*, 1996; Wouda *et al.*, 1999). Otros estudios demostraron la asociación del tipo de crianza (Moore *et al.*, 2002) y tamaño de explotación, principalmente aquellos establos con explotaciones de mediano y gran tamaño como lo indica Ortega-Mora *et al.* (2001). Otro papel importante en la transmisión es la edad y el número de partos transmitido mediante la ingestión de los ooquistes tanto en vacas lecheras como de carne (Dubey *et al.*, 2007; Llano *et al.*, 2018). El tipo de reposición es considerado también un factor desencadenante para el mantenimiento del parásito por mantener la transmisión vía transplacentaria (Collantes, 2003). Según Dubey *et al.* (2017) la aparición de la enfermedad puede presentar asociación con las bajas temperaturas y humedad, que favorecen el desarrollo de los ooquistes. La presencia de otros animales como las aves se encuentran en exposición a la infección por alimentarse en el suelo lo que podría contribuir a la diseminación del parásito (de Barros *et al.*, 2018; Nazir *et al.*, 2018)

Junto a la presencia de *Neospora caninum* en las explotaciones, puede coexistir otras infecciones de origen infeccioso o no infeccioso que generen inmunodepresión (Barr *et al.*, 1994). En el año 2009, Rodríguez determinó que la presencia de fetos abortados se debía también a otros agentes como *Brucella abortus*, *Leptospira spp.*, siendo el más importante el virus de la Diarrea viral bovina (VDVB); el cual, es muy asociado con la neosporosis debido

al mecanismo de inmunosupresión. En el Perú, actualmente se han realizado estudios determinando la coinfección de ambas enfermedades (Arauco y Rosadio, 2015).

La característica clínica de *N. caninum* es el aborto que produce en bovinos gestantes provocando fetos momificados, abortados o retenidos y una vez expulsado, suele eliminarlo junto con la placenta (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 2017). Este aborto puede producirse en vacas primerizas como en multíparas; encontrando la posibilidad de repetirse en la siguiente gestación (Stenlund *et al.*, 1999; Pabón *et al.*, 2007). En el caso de ocurrir una infección en la etapa inicial de la gestación, diversos estudios anteriores demostraron que el feto puede ser reabsorbido y la vaca puede presentar repetitividad de celo (Moore *et al.*, 2002; Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2006). Otros trabajos como el de Anderson *et al.* (2000) dieron a conocer que se puede generar la muerte y momificación de fetos aproximadamente en el segundo y tercer mes de gestación. Por otra parte, existe una gran presencia de terneros clínicamente sanos pero crónicamente infectados. Estos terneros pueden presentar sintomatología nerviosa y muscular observándose a los 4 a 5 días postparto y en algunos casos después de 2 semanas, observando manifestaciones clínicas nerviosas como ataxia, convulsiones, disminución en el reflejo patelar, disminución de peso, exoftalmia, etc (Martínez y Cruz, 2013). Esto, puede deberse a la presencia de los taquizoitos en la placenta produciendo inflamación y próxima luteólisis mediada por las prostaglandinas que generarán contracciones en el útero y la expulsión del feto (Dubey *et al.*, 2017). En el caso de la madre, no se ha demostrado manifestaciones clínicas características, pero conforme aumente el número de pariciones, el factor de riesgo de aborto disminuye sugiriendo el desarrollo de una inmunidad adquirida que impida la transmisión (Dubey *et al.*, 2007).

La neosporosis causa pérdidas económicas asociadas con el descenso de producción láctea, corta vida productiva, mortalidad neonatal elevada, muerte fetal temprana, reabsorción embrionaria, retorno de celo, incremento del tiempo de concepción, infertilidad, compra de ganado de sacrificio, entre otros; encontrando asociación con la presencia de *N. caninum* (Pfeiffer *et al.*, 2002; Hall *et al.*, 2005; Pulido *et al.*, 2017). Además, la venta de ganado sospechoso con la infección podría ser considerada como una gran parte de pérdida económica debido a la disminución del valor de la carne (Trees *et al.*, 1999).

En el Perú, los estudios basados en la presencia de la infección son en base a pruebas serológicas y se han encontrado prevalencias de anticuerpos contra *Neospora caninum* de bovinos lecheros como por ejemplo el primer reporte realizado en Arequipa, donde se determinó que el 57% de animales presentaban neosporosis en el ganado lechero (Andresen, 1999). En el año 2000, Rivera *et al.*, determinaron la presencia de *Neospora caninum* en 16 fetos abortados realizado en el valle en Lima; como también, en el mismo año, Cabrera *et al.* (2000) encontró la presencia de este parásito en el departamento de Cajamarca obteniendo la conclusión de que el 43 % de vacas fueron seropositivas. Luego de esto, se siguieron desarrollando diversos estudios en otras zonas como en el Valle de Lima donde se obtuvo que el 29.6 % presentaban esta enfermedad (Silva *et al.*, 2002) y del 33,2 % según Fernández (2018). En Cajamarca se determinó que el 45.9 % y 22.4 % de las vacas y crías, respectivamente, fueron seropositivas (Linares, 2003) y Escurra (2003) realizó un estudio en Cajamarca con ganado criado de manera extensiva encontrando una prevalencia del 45.9 %. Además, se encontró una prevalencia de 40.4 % en Chachapoyas (Quevedo *et al.*, 2003); 18.1 % en Puno (Atocsa, 2005); 28.7 % en Tacna (Vélez *et al.*, 2013); 18.8 % en Cerro de Pasco (Portocarrero *et al.*, 2015), Chávez *et al.* (2006) encontró que el 12.8 % eran

seropositivas de muestras procedentes de la SAIS Pachacútec; en cambio, en Junín se halló 46.7 % de prevalencia según Granados (2012) y 15.3 % en el 2018 determinado por Arauco. A pesar de esto, es necesario continuar realizando estudios sobre la epidemiología de *N. caninum* en el Perú. Figura 2.



Figura 2. Presentación de casos positivos según la seroprevalencia en el Perú de *N. caninum* (Cabrera *et al.*, 2000; Rivera *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002; Quevedo *et al.*, 2003; Atocsa, 2005; Granados, 2012; Portocarrero *et al.*, 2015).

El diagnóstico de *N. caninum* puede ser dificultoso debido a que la mayoría de casos se presentan de manera asintomática en los animales infectados crónicamente y la presencia de fetos abortados con bajo número de la parasitosis (Jenkins *et al.*, 2002). Esto puede ser demostrado mediante pruebas serológicas como no serológicas. Dentro del diagnóstico serológico se puede encontrar distintas pruebas como el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), cuya ventaja es el bajo costo y poca demanda de tiempo. Dentro de la

gran variedad de ELISA, el más utilizado para la detección de este parásito es el ELISA indirecto empleándose muestras de suero, leche y líquidos fetales que permitan detectar anticuerpos (Ortega-Mora *et al.*, 2006). La técnica de Inmunoblot (IB) es importante en la detección de antígenos inmunodominantes y es la técnica confirmatoria de otras pruebas como IFI o ELISA (Atkinson *et al.*, 2000). Otra prueba determinada es la aglutinación directa que requiere de taquizoitos fijados en formalina y de diluciones del suero con la finalidad de observar la formación de aglutinación si es que existe la presencia de anticuerpos específicos (Packham *et al.*, 1998). La Inmunofluorescencia indirecta (IFI) sigue siendo una de las pruebas estándar que son utilizadas y comparadas con otras técnicas desarrolladas (Ortega-Mora *et al.*, 2006). Los resultados positivos muestran una fluorescencia que bordea al taquizoito y un resultado negativo solo muestra la fluorescencia en la zona apical del parásito (Björkman y Uggla, 1999). Las ventajas de esta técnica son la especificidad y sensibilidad que presentan en la detección de *N. caninum* basados en estudios previos (Wouda *et al.*, 1997a; Pinedo *et al.*, 2014).

Dentro de las técnicas no serológicas se encuentran la histopatología observando lesiones en el cerebro, luego en el corazón, hígado, riñones (Anderson *et al.*, 2000; Sánchez-Castilleja *et al.*, 2018). Otra prueba es la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) en la que se puede identificar y amplificar los fragmentos de ADN, de diversos tejidos dando la posibilidad de reconocer la presencia de *Neospora caninum* basados en los primeros estudios desarrollado por Dubey (1999). Actualmente, esta técnica demostró la detección de neosporosis en muestras de sangre de vacas o heces colectados de perros infectados de manera natural, determinando la capacidad de esta prueba para detectar la presencia del parásito en distintos tipos de muestras (Okeoma *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014). La ventaja de

esta técnica es que permite amplificar una pequeña cantidad de ADN, demostrando una alta especificidad y sensibilidad; por otro lado, esta técnica no es rutinaria debido a su alto costo (Sager *et al.*, 2001; Van Maanen *et al.*, 2004).

En la actualidad no se ha podido determinar un adecuado tratamiento o el desarrollo de una vacuna capaz de otorgar inmunidad por lo que, en este caso, las medidas de control son las únicas vías para evitar la diseminación (McAllister, 2016). La principal medida de control que se debe tomar es la identificación de animales positivos, tomando en cuenta que si la prevalencia es alta, lo mejor es eliminar a aquellas vacas positivas o separarlas de donde se encuentren las vacas sanas (Thurmond y Hietala, 1997; McAllister, 2016). La presencia de perros en los establos debe ser evitada ya que estos pueden diseminar la enfermedad mediante el consumo de las placentas o fetos abortados pudiéndose evitar la diseminación al hospedero definitivo (Thurmond y Hietala, 1997; Anderson, 2000). Otras formas de control de la enfermedad pueden darse por medio de la realización de controles sanitarios antes de introducir un nuevo animal, realizar inseminación artificial o transferencia de embriones (Dubey *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2001). Finalmente, se debe llevar un control adecuado de la presencia de hospederos intermediarios como ratones u otras especies (Lindsay *et al.*, 1999; de Barros *et al.*, 2018).

En caso de establos con presencia de *N. caninum* estos deben ser notificados ante SENASA. Este servicio requiere de un diagnóstico confirmatorio mediante estudios en fetos abortados o muestras histopatológicas. Dentro de esto, se incluye el estudio de otras especies de animales que pueden funcionar como reservorio de la enfermedad para los bovinos. Además, esta institución requiere de la repetición del muestreo después de 15 a 30 días ya

que permite observar los niveles de anticuerpos en comparación al primer muestreo, en la que se debería observar un aumento significativo (SENASA, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En el Perú, los índices de eficiencia reproductiva son bajos destacándose una baja fertilidad y alta mortalidad embrionaria. Teniendo en consideración el mal manejo y fallos de inseminación, no se consideran los aspectos sanitarios ni a los agentes infecciosos causantes de abortos. Tomando en cuenta el largo ciclo reproductivo en estas especies, se hace necesario estudiar dichos aspectos dentro de la problemática de la salud animal como en *Neospora caninum*, así como con otros agentes parasitarios e infecciosos. Considerando, los escasos datos que se tienen sobre la neosporosis como agente causal de abortos en rumiantes del Perú, así como la necesidad de conocer las repercusiones económicas y sanitarias de esta enfermedad en nuestro país, el presente estudio pretende determinar la presencia de *Neospora caninum* en abortos bovinos de establos lecheros mediante la utilización de una técnica de diagnóstico molecular como lo es el PCR, esta técnica podría ser utilizada para estudios de prevalencia a futuro.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Determinar la frecuencia de fetos bovinos abortados en establos lecheros del valle de Lima con la presencia de *N. caninum*.

4.2 Objetivos específicos:

- Determinar la frecuencia entre los fetos abortados en los establos de Huacho y Cañete.
- Determinar la presencia de *N. caninum* en los distintos órganos de los fetos abortados.
- Establecer asociación entre la presencia de neosporosis con las variables sexo, edad y procedencia.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de muestreo y procesamiento

El muestreo se llevó a cabo en establecimientos ganaderos con propósito lechero, localizados en la zona norte y sur del valle de Lima. En la zona norte, se muestreó en un establo ubicado en el distrito de Huacho. Este establo está situado a una altitud de 67 m.s.n.m. y posee una temperatura media anual de 19.2 ° C. En la zona sur, el muestreo se realizó en un establo ubicado en el distrito de Cañete, encontrándose a una altitud de 40 m.s.n.m y posee una temperatura media anual de 24.5 ° C. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (FAVEZ-UPCH).

5.2 Diseño del estudio

El diseño correspondió a un estudio observacional, descriptivo y transversal.

5.3 Población en estudio

La población objetivo fueron los fetos abortados de manera espontánea de establos lecheros procedentes de madres que correspondían a la raza Holstein, ubicados en el valle de Lima, de 2 establecimientos lecheros de crianza intensiva que aceptaron participar en el estudio con el objetivo de informar los resultados.

5.4 Tamaño de muestra

El diseño corresponde a un estudio descriptivo, donde el tamaño de la muestra fue determinado mediante la fórmula para detección de una enfermedad (Thrusfield, 2005). Se utilizaron ciertas restricciones utilizando un nivel de confianza del 95% y una prevalencia esperada como mínimo del 10% (Moroni *et al.*, 2018). Se notificó a los encargados del estable logrando recuperar un total de 40 fetos abortados debido a la disponibilidad de muestras.

5.5 Criterios de inclusión

Se consideraron dentro del estudio todos aquellos fetos que fueron abortados de manera espontánea encontrándose entre el primer y último tercio de gestación cuyas madres fueran primíparas o multíparas. Además los fetos abortados considerados en el estudio fueron aquellos que se encontraban frescos, es decir aquellos que fueron abortados el mismo día y se encontraban completos. Se confirmó la participación y aceptación de entregar las muestras provenientes de cada estable.

5.6 Criterios de exclusión

El estudio no consideró aquellos fetos que presentaban grado severo de autólisis o fetos momificados que no permitieran realizar los procesos moleculares. Además, no consideró aquellos órganos que estaban putrefactos o fetos incompletos; es decir, que no contaban con la cabeza.

5.7 Consideraciones éticas

La presente Tesis de Postgrado pertenece a un Proyecto de investigación financiado por el FINCyT llamado “Obtención y caracterización del primer aislado de *Neospora caninum* causante de abortos y mortalidad neonatal en la producción bovina lechera del Perú, con fines inmunodiagnóstico y vacunal.” Con código de proyecto: PIAP-3-P-945-14. Este mismo ha sido aprobado por el Comité Institucional de Ética para el uso de animales. Las condiciones de bioseguridad y los cuidados al realizar las mediciones buscaron proteger la salud del investigador y evitaron someter a los animales a molestias o estímulos nuevos innecesarios durante el desarrollo del proyecto.

5.8 Colección de muestras

Se tomaron en cuenta los registros de las fechas de parición con el fin de obtener los fetos frescos, por lo cual se guardó comunicación directa con los establos evaluados para evitar que ocurra el deterioro de los órganos a analizar. En estos casos se tuvo que esperar hasta el momento que ocurría la parición para recolectar los fetos abortados de manera espontánea y ser trasladados mediante cajas de tecnopor con hielo para conservar los órganos hasta su próximo análisis.

Los fetos abortados de manera espontánea fueron sometidos a la necropsia y selección de órganos como cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñones, timo, bazo, médula espinal,

glándula adrenal e intestino delgado para luego proceder a la extracción de ADN conservándolos a -20 °C hasta su procesamiento.

Todos los animales que fueron considerados en el estudio se encontraban bajo la supervisión veterinaria en los establos en la que se contaban con registros reproductivos.

Las muestras de cada feto se acompañaron de una ficha individual con los datos del feto (sexo, edad y procedencia) incluyendo información epidemiológica. Estos datos fueron colocados en una ficha realizada para el presente estudio. Anexo 1

5.9 Procesamiento de muestras

Las muestras de órganos de los fetos abortados fueron analizadas mediante la prueba molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada en el laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

5.9.1. Extracción de ADN:

Se empleó como método de extracción un kit comercial: DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) con algunas modificaciones. La extracción del ADN se realizó a partir de 20 mg de tejido conservado en congelación. Se procedió a disgregar las muestras con bisturí en placas Petri estériles. Primero, se procedió a realizar la lisis celular empleando buffer lisis con

proteinasas K suministrados en el kit y se incubó a 55 °C en Baño María hasta completar la lisis. Luego, se realizó la precipitación del ADN a través del empleo de etanol, buffers y las columnas que se encuentran incluidas en el Kit comercial. Posteriormente, se procedió a eluir con buffer el ADN de las columnas y finalmente ser conservado en un tubo de microcentrífuga (2 ml) estéril, rotulado y congelado a una temperatura de – 20 °C.

5.9.2 Cuantificación del ADN extraído:

La evaluación de la concentración de ADN se determinó por medio de la absorbancia por el método de espectrofotometría en equipo NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Para este procedimiento se utilizó el buffer de elución utilizado en el último paso de la extracción como solución blanco, la medición se realiza con 1uL de la muestra. La longitud de onda para la medición fue de 260 /280 nm con el fin de determinar la pureza y calidad de las muestras.

5.9.3 Detección de *N. caninum* mediante nested-PCR:

Esta técnica fue establecida y caracterizada anteriormente en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia donde se comprobó la validez de los cebadores con el fin de evitar reacciones cruzadas contra otro tipo de apicomplexos como *Toxoplasma* spp. o *Sarcocystis* spp. Constó de dos reacciones, en la cual, el producto que salió de la primera reacción, se utilizó en la segunda con el fin de tener mayor sensibilidad. Se amplificó la región ITS 1 del ADN ribosomal de *N. caninum* empleando 4 oligonucleótidos: (Buxton *et al.*, 1998; dos Santos *et al.*, 2011). La región de elección y los cebadores que se utilizaron, han sido empleados en estudios anteriores demostrando que la

región ITS 1 tiene una alta sensibilidad (71,42 %) y especificidad (100 %). (Sánchez *et al.*, 2009)

Secuencia de cebadores empleados en la primera reacción:

NN1 forward 5'- TCAACCTTTGAATCCCAA -3'

NN2 reverse 5' - CGAGCCAAGACATCCATT -3'

Secuencia de cebadores empleados en la segunda reacción:

NP1 forward 5'- TACTACTCCCTGTGAGTTG - 3'

NP2 reverse 5' - TCTCTTCCCTCAACGCT -3'

Primero, se calculó el volumen de los componentes a utilizar dependiendo del número de muestras que se analizó. La primera amplificación estuvo compuesta de los cebadores NN1 y NN2 en la que se utilizó 1,5 μM de cada uno, la muestra de ADN (20 ng/ μl), 10x del tampón DNA polimerasa, MgCl_2 (25mM), dNTPs (10 mM), Taq DNA polimerasa (5u/ μl) y 9,8 μl de agua. Las condiciones de temperatura que se utilizaron en el primer ciclo fueron las siguientes: 1 ciclo de 5 minutos a 94° C; luego, 25 ciclos de: 94 °C (1 minuto), 48 °C (1 minuto), 72 °C (1 minuto); y por último 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

En la segunda amplificación se realizó la misma mezcla pero en este caso se utilizó el producto de PCR de la primera reacción (5 μl) y los cebadores NP1 y NP2 (2 μM cada uno). Las condiciones que se utilizaron en el segundo ciclo fueron 25 ciclos de: 94 °C (30 segundos), 48 °C (30 segundos), 72 °C (30 segundos); y 1 ciclo de 72 °C por 5 minutos.

5.9.4 Electroforesis en gel de agarosa:

El producto resultante del PCR fue visualizado mediante un gel de agarosa al 1% utilizando bromuro de etidio (0,1 µg/ml) y observado bajo luz ultravioleta (MiniBis Pro). Como marcador de peso molecular se utilizó la escala de ADN de 100 bp que mide ADN de doble cadena con un rango de 100 a 1000 bp (Thermo Fisher Scientific, 100 bp DNA Ladder). El fragmento amplificado por PCR producto de la primera reacción fue de 421 bp, fragmento de la región ITS1 de apicomplejo *Neospora spp.* (Holmdahl *et al.* 1994). El segundo fragmento amplificado por PCR producto de la segunda reacción fue de 213bp, fragmento específico de *Neospora caninum* (Buxton *et al.*, 1998 ; Collantes, 2003)

Se utilizó como control positivo taquizoitos NC1 de *Neospora caninum* brindados por el departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, del grupo de investigación SALUVET (Salud Veterinaria y Zoonosis) en Madrid, España.

5.10 Análisis estadístico :

Los resultados fueron expresados en forma porcentual y la posible asociación entre las diferentes variables con la presencia de *N. caninum* fue analizada mediante pruebas de asociación como Chi cuadrado y utilizando el programa estadístico SPSS 15.0

5.11 Eliminación de muestras:

Las muestras fueron eliminadas mediante el uso de tachos cubiertos con bolsas de polietileno, especificando que sean residuos patógenos para finalmente ser incinerados. Por otro lado, se consideró que el material que entró en contacto con las muestras biológicas, sean colocados en otras bolsas del mismo material siendo identificados y separados. En el caso de fluidos biológicos, se consideró la eliminación previamente desinfectado y vertido por el desagüe con abundante agua.

6. RESULTADOS

La presencia del ADN de *N. caninum* fue analizada mediante PCR anidada de la región ITS-1 a partir de muestras de fetos provenientes de los establos de Huacho y Cañete. Se recolectó un total de 40 fetos abortados de manera espontánea que procedían de madres previamente evaluadas en estudios anteriores realizados dentro del proyecto, en la cual se determinó que el 90% de estas, eran seropositivas a *N. caninum*, donde la edad de mayor presentación de casos fueron aquellas mayores a 4 años, multíparas y con antecedentes de aborto (Datos no publicados, Serrano Martínez Enrique). Tabla 1.

En la zona sur se estudió un total de 21 fetos abortados, mientras que en la zona norte fue de 19 muestras. En el distrito de Cañete, los antecedentes de abortos que presentaba el establo estudiado fue de 49% (49/100) y en el distrito de Huacho, fue de 35% (63/180). Ambos establos contaban con bovinos de raza Holstein.

En cuanto a la extracción de ADN, fueron consideradas muestras de buena calidad aquellas que estaban entre el ratio de Absorbancia 260/280 de 1,6 y 2 según lo establecido por Sambrook *et al.*, (1989). Se realizó el primer PCR determinando la presencia del género *Neospora* seguido de un segundo PCR determinando la especie *N. caninum*. Se evaluaron 40 fetos abortados y el 37.5% (15/40) de éstos, resultaron positivos a la presencia de ADN de *Neospora caninum*. Figura 3.

En las muestras positivas, se detectó que el 31,58% (6/15) provenían de la región de Huacho y el 42,86 % (9/15) de Cañete, determinando mayor frecuencia en las muestras provenientes en la zona sur del valle de Lima. La frecuencia de la enfermedad según la procedencia se detalla en la Tabla 2.

Con respecto al sexo, se observó que dentro de aquellos animales positivos a la parasitosis, las hembras presentaron mayor frecuencia del 53.33% (8/15) comparado a lo encontrado en machos 46.67% (7 /15). Los resultados de la variable sexo se encuentran explícitamente en la Tabla 3.

Otra variable considerada en el estudio fue la edad gestacional en la cual ocurrió el aborto, encontrándose mayor presentación en el segundo tercio de gestación 60% (9/15), seguido del último tercio de gestación donde el 26,6% de fetos eran positivos (4/15) y primer tercio 6,7% (1/15). En cuanto a la edad fetal, se observó que en el quinto mes de gestación presentaron mayores casos de aborto en comparación a los demás meses (26.67%). Ver Tabla 3.

En la tabla 4, se puede apreciar la frecuencia de detección del ADN de *N. caninum* según el órgano analizado. El encéfalo, del cual se incluyó 3 cortes en cada muestra (cerebro, cerebelo y parte del tronco encefálico) fue el órgano que presentó mayor frecuencia de presentación del ADN del parásito estando presente en todas las muestras positivas (15/15). El segundo órgano más frecuente fue el pulmón, encontrándose en el 26,6% de las muestras positivas y seguidas del hígado y corazón mostrándose en el 20% de los animales positivos. En otros órganos como el riñón fue de 13,3% (2/15), timo 6,7% (1/15), intestino 6,7% (1/15),

glándula adrenal 13,3% (2/15) y bazo 13,3 % (2/15) se encontraron en menor frecuencia. En el caso de la médula espinal no se encontró ninguna muestra positiva a *Neospora caninum*. (Ver Tabla 4).

Se analizó la asociación de las variables con respecto a la presencia de *Neospora caninum* en fetos abortados no encontrando asociación entre las variables sexo, edad y procedencia mediante la prueba de Chi cuadrado.

Tabla 1. Distribución de datos de las progenitoras de los fetos abortados recolectados de manera espontánea relacionados con la presencia a *N. caninum*.

	Variable	Muestras (n)	Porcentaje (%)
1.ELISA	Positivo	36	90
	Negativo	4	10
2.Edad	15 a 24 meses	2	5
	2 a 4 años	16	40
	> 4 años	22	55
3. Servicios	Primeriza	9	22.5
	Múltiparas	31	77.5
4.Antecedentes	Si	40	0
	No	0	100
Total		40	100

Tabla 2.- Distribución de fetos abortados de bovinos lecheros positivos a *N. caninum* por las técnica de PCR, según la región de procedencia (2016-2017).

*Región	Muestras (n)	Positivas	
		Nº	%
Huacho	19	6	31,6 (6/15)
Cañete	21	9	42,9 (9/15)
Total	40	15	37,5 %

*Asociación de variable procedencia y la presencia de neosporosis; Significación (p): 0.46

Tabla 3. Distribución de fetos abortados de bovinos lecheros positivos a *N. caninum* por la técnica de PCR, según el sexo y edad. (2016-2017)

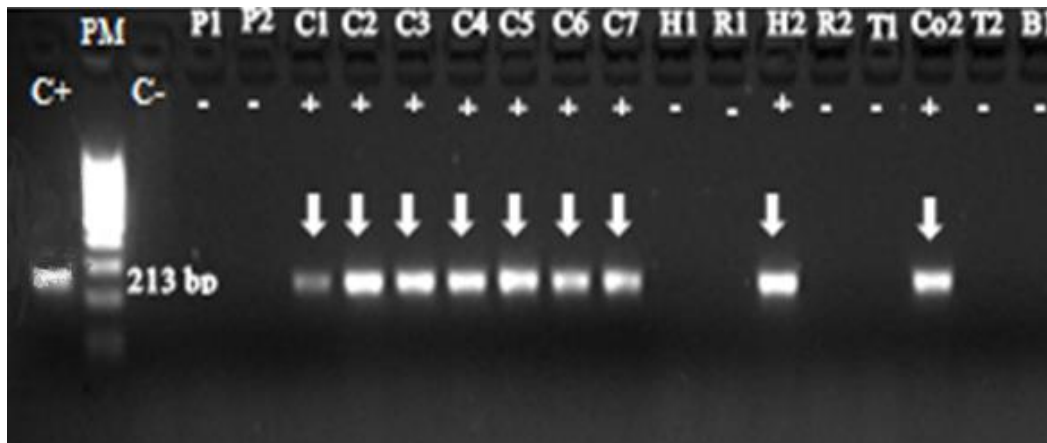
Variable	Muestras (n)	Porcentaje
		%
a. Sexo		
Macho	7	46,7
Hembra	8	53,3
b. Edad		
3 meses	1	6,7
4 meses	2	13,3
5 meses	4	26,7
6 meses	3	20
7 meses	3	20
8 meses	1	6,7
9 meses	1	6,7
Total	15	100

- a. Asociación de variable sexo y la presencia de neosporosis ; Significación (p) : 0.93
b. Asociación de variable edad y la presencia de neosporosis ; Significación (p): 0.07

Tabla 4.- Distribución de fetos abortados positivos a *N. caninum* mediante PCR según el órgano de ubicación (2016-2017).

Nº. Fetos	Región	Resultados de PCR en:									
		CER	PUL	HIG	RIÑ	COR	TIM	BAZ	ME	GA	INT
1	C	+	-	-	-	AU	-	-	AU	-	-
2	C	+	-	+	-	+	-	-	NR	-	NR
3	H	+	-	-	+	-	AU	-	-	+	-
4	C	+	-	AU	-	-	-	-	NR	-	AU
5	H	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+
6	C	+	-	-	-	-	-	-	NR	-	-
7	H	+	+	+	-	+	-	-	NR	+	-
8	C	+	-	-	-	-	-	-	NR	-	NR
9	C	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
10	H	+	+	-	-	-	NR	-	-	-	-
11	H	+	-	-	-	+	NR	-	-	-	-
12	C	+	-	-	-	-	-	-	AU	-	AU
13	H	+	+	-	-	-	+	-	NR	-	NR
14	C	+	-	AU	-	-	-	-	AU	-	-
15	C	+	-	-	-	-	-	-	NR	-	-
Total		15/15	4/15	3/15	2/15	3/15	1/15	2/15	0/15	2/15	1/15
Porcentaje %		100	26,6	20	13,3	20	6,7	13,3	0	13,3	6,7
AU: Autolisis		GA: Glándula adrenal				NR: No se recolecto					
BAZ: Bazo		HIG: Hígado				PUL: Pulmón					
C: Cañete		INT: Intestino con Placas de Peyer				RIÑ: Riñón					
CER: Cerebro		ME: Médula espinal				H: Huacho					
COR: Corazón		+: Positivo a la prueba		-: negativo a la prueba		TIM: T					

Figura 3. Electroforesis en gel de Agarosa al 1% donde se muestran los resultados del PCR para *Neospora caninum* en muestras de fetos abortados.



*C+ : Control positivo; C- : control negativo ; **PM**: banda de peso molecular; **P1,P2**: pulmón feto 1 y feto 2;
C1,C2,C3,C4,C5,C6,C7: corazón feto 1,2,3,4,5,6 y 7; **H1,H2** :hígado feto 1 y 2; **R1, R2**: riñón feto 1 y 2; **T1,T2** : timo feto 1 y 2; **Co2**: corazón feto 2; **B1** : bazo feto 1.

7. DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó en dos establos del valle de Lima, ubicados en el norte y sur de la ciudad, lugares donde se han reportado casos de problemas productivos con diagnóstico no conocido. Se analizó un total de 40 muestras de fetos abortados; en los cuales, se detectó la presencia de *N. caninum* mediante PCR en el 37,5% (15/40) determinando la presencia de la enfermedad en fetos abortados en el valle de Lima.

Estudios anteriores demostraron la presencia de *N. caninum* en 16 de 29 fetos abortados de vacas lecheras en el valle de Lima, confirmando la presencia de este parásito en la ciudad de Lima y demostrando la persistencia de la enfermedad (Rivera *et al.*, 2000; Fernández, 2018; Serrano *et al.*, 2018). Recientes estudios han empleado también pruebas moleculares y algunas serológicas confirmando la presencia de esta parasitosis en distintos países de América Latina y a nivel mundial obteniendo porcentajes desde 12.2% en Chile (Moroni *et al.*, 2018), 20.3% en Argentina (Fort *et al.*, 2015), 43,5% en Ecuador (Bernardi y Cueva, 2015), 63% en Colombia (Vargas-Niño *et al.*, 2018), 71.4% en Brasil (de Aquino *et al.*, 2019) y 80% en México (Medina *et al.*, 2006). Otros países han continuado las

investigaciones sobre la frecuencia de esta enfermedad pudiendo encontrar reportes actuales como en Irán presentando una frecuencia del 5.7% (Amouei *et al.*, 2019), 7.6 % en China (Luo *et al.*, 2018), 19% en Tunisia (Amdouni *et al.*, 208) y 18.2% de casos positivos en Canadá (Wilson *et al.*, 2016).

Sin embargo, la detección de *N. caninum* no permite demostrar que los abortos sean causados principalmente por este parásito ya que la infección lleva principalmente al nacimiento de terneros congénitamente infectados (Pereira-Bueno *et al.*, 2000; de Aquino *et al.*, 2019) y la presencia de este puede encontrarse en asociación con otras enfermedades como *Brucella abortus*, *Leptospira spp.*, virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina y sobretodo el virus de la diarrea viral bovina, todos ellos relacionados a inmunosupresión (Rodríguez, 2009; Vargas-Niño *et al.*, 2018). Estudios realizados en Perú demuestran la coexistencia de virus de la diarrea viral bovina y *N. caninum* (Arauco y Rosadio, 2015)

El resultado de la frecuencia obtenida en el presente estudio puede deberse a distintos factores que influirían en la presentación como el tipo de crianza, los hospederos definitivos, la edad, sexo, hospederos intermediarios (caninos, roedores, aves) propios de la zona, los cuales favorecen el desarrollo del ciclo de vida de *N. caninum* (Dubey, 2010; Dubey, 2017).

El tipo de crianza de los bovinos lecheros en la zona de estudio fue de tipo intensivo; por ende, este factor podría favorecer la exposición frente al agente, confirmando que los establos con crianza intensiva en vacas lecheras presentan mayor probabilidad de transmisión que las explotaciones de crianza cárnica (Moore *et al.*, 2002). Ortega-Mora *et al.* (2001)

describe la misma asociación con respecto al tamaño de explotación, reconociendo la importancia de explotaciones de mediano y gran tamaño.

Por otro lado, en los establos evaluados se observó la presencia de perros tanto en su interior como en los alrededores que actúan como hospedero definitivo del ciclo biológico de *N. caninum*, favoreciendo la diseminación mediante la eliminación de *N. caninum* por medio de las heces o por el consumo de restos placentarios, fetos abortados o fluidos fetales producto de abortos o partos recientes (McAllister *et al.*, 1998; McAllister 2016). Además, estos animales tenían acceso al alimento o agua de bebida lo que permitiría la contaminación por medio de los ooquistes infectivos (Moore, 2005). En los establos evaluados, se contaron más de tres perros por establo lo que permitiría la amplia asociación entre la presencia de *N. caninum* con el número de perros observados (Puray, 2005; Portocarrero *et al.*, 2015). Por otro lado, la presencia de otros mamíferos, roedores, aves inclusive de insectos, puede también permitir la diseminación de la neosporosis por actuar estos también como hospederos, vectores o reservorios (Conzuelo, 2011; Rahpaya *et al.*, 2018).

Según la procedencia, los establos que fueron evaluados no contaban con un control adecuado o sanitario de la enfermedad, lo que facilitaría el ingreso de la infección ya sea mediante la adquisición de animales de reposición, considerado un factor desencadenante para el mantenimiento del parásito (Collantes, 2003). Además, un factor controversial es el ingreso de animales de reposición provenientes de Arequipa lo que podría estar asociado al mayor porcentaje de presentación de la enfermedad en la zona sur de Lima; como también, el uso de semen proveniente de este departamento con una seroprevalencia del 57% y 48.9% de *N. caninum* (Andresen ,1999; SENASA, 2011). Por otro lado, estudios anteriores

analizaron la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en Cajamarca, determinando una prevalencia del 42.9% y 19,6%, lo que podría relacionarse con los resultados encontrados en la zona norte. (Cabrera *et al.*, 2000; SENASA 2011). La introducción de un nuevo animal al establo implica un gran riesgo ya que en estudios anteriores se han reportado casos de neosporosis al adquirir nuevos animales y permitir el ingreso de estos sin un control o diagnóstico adecuado (Puray, 2005).

En lo que respecta al sexo, se observó una frecuencia mayor en el caso de las hembras (53.3%). Sin embargo, esta variable no es estadísticamente significativa con respecto a la enfermedad por lo que, reportes previos describen que la variable sexo no representa un factor predisponente para la presentación de la infección como el realizado por Vega *et al.* en el año 2010 . Esto, puede determinar que no existe asociación de la presentación de neosporosis en relación al sexo del feto abortado, encontrándose tanto en hembras como en machos.

Con respecto a la edad fetal del aborto se encontró mayor frecuencia entre el quinto y séptimo mes, teniendo relación con los primeros reportes realizados por Dubey y Lindsay (1996) donde describen que los abortos por *N. caninum* pueden estar situados entre el tercer y noveno mes de gestación, presentándose con mayor frecuencia entre el cuarto y sexto mes. Buxton *et al.* (2002) describe que el feto no es capaz de desarrollar una respuesta inmune suficiente en el segundo tercio de gestación; es por eso que, es característico encontrar abortos entre el quinto y séptimo mes de gestación. Los resultados obtenidos coinciden con lo demostrado por Collantes realizado en el año 2003 y confirmado por estudios como el de Medina *et al.*, en el año 2006 observando abortos ocurridos en un promedio de 5.6 meses de

gestación. En el Perú, actualmente se desarrolló un estudio evaluando la presencia de abortos por *N. caninum* encontrando mayores casos en el segundo tercio similar al presente estudio (Fernández, 2018)

Se conoce que en infecciones por *N. caninum* el órgano diana es el cerebro durante la fase crónica y dónde se observan los quistes tisulares; seguido de otros órganos como corazón, pulmón e hígado (Anderson *et al.*, 1991; Dittrich *et al.*, 2018; Hoseini *et al.*, 2018). Esto guardaría similitud con los resultados obtenidos, observando que todas las muestras de cerebro fueron positivas mediante PCR. Las lesiones macroscópicas observadas como focos de necrosis, no permite el diagnóstico de la enfermedad por lo que podría estar asociado al deterioro de la muestra o la presencia de otros agentes infecciosos no considerándose como lesiones macroscópicas patognomónicas (Sánchez-Castilleja *et al.*, 2018). Por otra parte, la presentación de la infección en los diferentes órganos de los fetos fue menor en comparación con los fetos del último trimestre demostrando una disminución en la carga parasitaria o con respecto a la ubicación del parásito, asociándolo a la inmunocompetencia que desarrolla el feto para controlar la infección. (González *et al.*, 1999; Almería y López-Gatius, 2015).

El presente estudio logró detectar la infección por *N. caninum* mediante PCR anidada de diferentes órganos de fetos abortados. El protocolo que se empleó para esta técnica fue muy eficaz para determinar la presencia del parásito en fetos abortados, incluyendo la presencia de autólisis en distintas muestras. A pesar de esto, estas infecciones son difíciles de erradicar ya que los ganaderos no mantienen un adecuado conocimiento de la parasitosis y es difícil controlarla si no se mantiene un adecuado manejo sanitario. Es por eso que, es importante dar a conocer la información obtenida a los ganaderos con el fin de brindar

conocimiento sobre la problemática y tomar medidas de control e implementación que evite la diseminación de la infección tomando importancia de esta enfermedad.

Por otro lado, el estudio tuvo como limitaciones el acceso a diversos establos ubicados en el valle de Lima, lo que hubiera permitido obtener mayor cantidad de muestras; esto, debido a una falta de información y participación de los establecimientos que no contaban con el conocimiento previo de la parasitosis. Dentro de los establos muestreados, no se pudo recolectar muestras de placenta lo que hubiera permitido demostrar la presencia de *N. caninum* en este órgano con resultados positivos demostrado en estudios previos.

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con los datos obtenidos se puede concluir:

- *N. caninum* fue detectado molecularmente en fetos abortados provenientes de establos de Lima obteniendo una frecuencia del 37,5 %.
- La frecuencia de ADN de *N. caninum* determinado mediante la técnica de PCR en feto abortados de bovinos lecheros de los establos lecheros muestreados fue de 31,6 % en Huacho y 42,9% en Cañete.
- Las variables edad y sexo no se encontraron asociadas a la presencia ADN de *N. caninum* en bovinos.
- El cerebro es el principal órgano en donde se detectó la presencia de *N. caninum* siendo independiente al periodo de gestación.

9. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Abril M. y Siguenza N .2019. Evaluación de la aplicación de dos ensayos moleculares (PCR y LAMP) para la identificación de material genético de *Neospora caninum* en sangre de *Canis lupus familiaris* (perro). Tesis de Licenciatura. Universidad de Cuenca, Ecuador.
2. Almería S. y López-Gatius F. 2015. Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis. *Research in veterinary science*. 100: 169-175.
3. Almería S., Serrano B., López F. 2017. Immune response in bovine neosporosis: Protection or contribution to the pathogenesis of abortion. *Microbial Pathogenesis*. 109: 177–182.
4. Álvarez G., Pereira J., Gómez M., Ortega L, 2002. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite anti-gens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Vet.Parasitol*. 107: 15–27.
5. Amdouni Y., Amairia S., Said Y., Awadi S., Gharbi M. 2018. First molecular detection and phylogenetic analysis of *Neospora caninum* DNA from naturally infected goats in Northwest Tunisia. *Acta parasitológica*. 63(4): 709-714.
6. Amouei A., Sharif M., Sarvi S., Nejad R., Aghayan S., Hashemi-Soteh M., Sarafrazi M. 2019. Aetiology of livestock fetal mortality in Mazandaran province, Iran. *Peer J*. 6, 5920.
7. Anderson L., Blanchard P., Barr,B., Dubey J., Hoffman R., Conrad P. 1991. Neospora like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc*. 198:241-244
8. Anderson L., Reynolds J., Rowe J., Sverlow K., Packham A., Barr B., Conrad P. 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora sp.* infection in dairy cattle. *J.Am.Vet.Med.Assoc*. 210:1169-1172.
9. Anderson L., Andrianarivo G., Conrad A. 2000. Neosporosis in cattle. *Anim Reprod Sci* 60/61: 417-431

10. Andresen H. 1999. Neosporosis en el Perú y el Mundo. Rev Cien Vet Perú 15 (4): 11-16
11. Arauco F. y Rosadio R. 2015. Seroprevalencia de Diarrea Viral Bovina y Neosporosis en Vacas de de la Región Junín, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 26(3): 543-547.
12. Atocsa H., Chávez V., Casas A., Falcón, P. 2005. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros criados al pastoreo en la provincia de Melgar, Puno. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 16(1): 71-75.
13. Arauco F. 2018. Seroprevalencia y factores de riesgo de neosporosis bovina en el valle del Mantaro-Región Junín, Perú. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 29(4), 1430-1439.
14. Atkinson R., Cook R., Reddacliff L., Rothwell J., Broady K., Harper P., Ellis J. 2000. Seroprevalence of *Neospora caninum* infection following an abortion outbreak in a dairy cattle herd. Aust Vet J 78: 262-266.
15. Barling K., Sherman S., Peterson M., Thompson J., McNeill J., Craig T., Adams L. 2000. Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 217:1361-1365.
16. Barr B., Rowe J., Sverlow K., BonDurant R., Ardans A., Oliver M., Conrad P. 1994. Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolate. J. Vet. Diagn. Invest 6:207-215.
17. Bernardi C. y Cueva M. 2015. Prevalencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en hatos de bovinos lecheros en tres parroquias del cantón Cuenca, Ecuador. Maskana. 6: 213-214.
18. Björkman C. y Ugglá A. 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol. 29: 1497-1507.
19. Buxton D., Maley S., Wright S., Thomson K, Rae A., Innes E. 1998. The pathogenesis of experimental neosporosis in pregnant sheep. J. Comp. Pathol. 118:267-279.
20. Buxton D., McAllister M., Dubey J. 2002. The comparative pathogenesis of neosporosis. Trends Parasitol. 18:546-552.
21. Cabrera M., Ortiz P., Claxton J., Williams D., Trees A. 2000. Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en ganado vacuno en Perú. Res. IV Congreso Peruano de Parasitología. p. 212

22. Chávez V., Casas A., Falcón N., Casas V. 2006. Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 17(2): 189-194.
23. Collantes E. 2003. Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. p 278
24. de Aquino Diniz L., Minutti A., Nino B., Costa L., Bosculo M., de Almeida B., de Barros, L. 2019. Vertical transmission of *Neospora caninum* in bovine fetuses from a slaughterhouse in Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 1-5.
25. de Barros L., Miura A., Minutti, A, Vidotto O., Garcia, J. 2018. *Neospora caninum* in birds: A review. *Parasitology international*.
26. Dijkstra, T., Barkema H., Hesselink J., Wouda, W. 2002. 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. Parasitology*. 105:89-98.
27. Dittrich R., Regidor-Cerrillo J., Ortega-Mora L., de Oliveira Koch M., Busch A., Gonçalves K., Cruz A. 2018. Isolation of *Neospora caninum* from kidney and brain of a bovine foetus and molecular characterization in Brazil. *Experimental parasitology*. 185:10-16.
28. Donahoe S., Lindsay S., Krockenberger M., Phalen D., Šlapeta J. 2015. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 4(2), 216-238.
29. dos Santos D., Andrade M., Varaschin M., Guimaraes A, Hirsch C. 2011. *Neospora caninum* in bovine fetuses of Minas Gerais, Brazil: genetic characteristics of rDNA. *Rev Bras Parasitol Vet*. 20:281-8.
30. Dubey J. 1999b. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol*. 84: 349-367
31. Dubey J. 1999a. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 214:1160-1163.
32. Dubey J. 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol*. 41(1):1-16.
33. Dubey J., Schares L., Ortega-Mora L. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev* 20: 323-367.

34. Dubey J .2010. Neosporosis of animals and humans. 2da edition U.S.A: CRC Press Taylor & Francis Group.p 33 – 46.
35. Dubey J., Lindsay D. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet.Parasitol. 67:1-59.
36. Dubey J., Bjerkas T., Bjorkman C., Blagburn B., Bowman D., Buxton D., Ellis J., Gottstein B., Hemphill A., Hill D., Howc D., Jenkins M., Kobayashi Y., Koudela B., Marsh A, Mattsson J., McAllister M., Modry D., Omata Y.,Sibley L., Speer C., Trees A., Uggla A., Upton S. Williams D., Lindsay D. 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its diferentiation from related coccidia. Int J Parasitol. 32: 929-946.
37. Dubey J., Buxton D., Wouda W. 2006. Pathogenesis of bovine neosporosis. J Comp Pathol 134: 267-289.
38. Dubey J., Schares G., Ortega-Mora L. 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev. 20(2): 323-367.
39. Dubey J., Hemphill A., Calero R., Schares, G. 2017.Neosporosis in animals.
40. Ellis J., McMillan D., Ryce C., Payne S., Atkinson R., Harper P. 1999. Development of a single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. Int. J. Parasitol. 29: 1589–1596.
41. Ecurra E. 2003. Seroprevalencia de Neosporosis bovina diagnosticada mediante inmunofluorescencia directa, en predio de la campiña de Baños del Inca, provincia de Cajamarca, en el año 2001. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.
42. Fávero J., Silva A., Campigotto G., Machado G., Barros L., Garcia J., Stefani, L. 2017.Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible cause-effect relation for disease. Microbial Pathogenesis. 110: 202–207.
43. Fernández R.2018. Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Neospora caninum* en bovinos de establos lecheros de las provincias de Lima y Cañete. Tesis de Licenciatura. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú.
44. Fort M., Edelsten M., Maley S., Innes E. 2015. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina. Acta parasitologica. 60(2): 275-282.
- 45.Gamarra M. 2001. Situación actual y perspectivas de la ganadería lechera en la cuenca de Lima. Máximo. Rev. investig. vet. Perú. 12 (2): 1-13.

46. Ghalmi F., China B., Ghalmi A., Hammitouche D., Losson B. 2012. Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. *Research in Veterinary Science*. 93: 655–661.
47. Gondim L., McAllister M., Pitt W., Zemlicka D. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34: 159–161.
48. González L., Buxton D., Atxaerandio R., Aduriz G., Maley S., Marco J., Cuervo L. 1999. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet. Rec.* 144:145-150.
49. Granados S. 2012. Frecuencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros de 4 distritos del Valle del Mantaro (Junín). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
50. Hall C., Reichel M., Ellis J. 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol.* 128: 231-241.
51. Hemphill A., Gottstein B., Kaufmann H. 1996. Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. *Parasitology*. 112 (2):183-197.
52. Holdmdahl O., Mattsson J., Ugglå A., Johansson K. 1994. The phylogeny of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 119:187-92.
53. Hoseini A., Merat E., Samani S., Nezhad S., Danandeh R. 2018. Comparison of *Neospora caninum* infected tissues in aborted fetal bovine by PCR. *Journal of Veterinary Research*. 73(3).
54. Jenkins M., Baszler T., Björkman C., Schares G., Williams D. 2002. Diagnosis and seroepidemiology of *Neospora caninum*-associated bovine abortion. *Int. J. Parasitol.* 32:631-636.
55. Klein C., Barua S., Liccioli S., Massolo A. 2019. *Neospora caninum* DNA in Coyote Fecal Samples Collected in an Urban Environment. *Journal of wildlife diseases*. 55(1): 196-199.
56. Li J., He P., Yu Y., Du L., Gong P., Zhang G., Zhang X. 2014. Detection of *Neospora caninum*-DNA in feces collected from dogs in Shenyang (China) and ITS1 phylogenetic analysis. *Vet Parasitol.* 205:361–364.
57. Linares L., Cabrera M., Ortíz P. 2003. Transmisión neonatal de *Neospora caninum* en ganado vacuno lechero de Cajamarca. 11 (3): 9-17.

58. Lindsay D, Dubey J, Duncan R. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 82: 327-333.
59. Llano H., Guimarães M., Soares R., Polo G., da Silva A. 2018. Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* infection in cattle from the eastern Antioquia, Colombia. *Veterinary and Animal Science.* 6: 69-74.
60. Luo H., Li K., Zhang H., Lan Y., Gan P., Shahzad M., Wang J. 2018. *Neospora caninum* infection in cattle, cows and goats in Jiangxi province, China. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* 49(4): 549-552.
61. Martínez G. y Cruz A. 2013. Actualización de la neosporosis bovina. *Conexión Agropecuaria JDC.*
62. McAllister M., Dubey J., Lindsay D., Jolley W., Wills R., McGuire A. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 28: 1473-1478.
63. McAllister M. 2016. Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 32(2): 249-266.
64. Medina L., Cruz-Vázquez C., Quezada T., Morales E., García-Vázquez Z. 2006. Survey of *Neospora caninum* infection by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, Mexico. *Veterinary parasitology.* 136(3-4): 187-191.
65. Minutti A., Costa L., Boscolo M., Garcia J. 2019. Vertical transmission of *Neospora caninum* in bovine fetuses from a slaughterhouse in Brazil. *Tropical animal health and production.*
66. Moore D., Odeon A., Venturini M., Campero C. 2005. Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. *Rev. Argentina Microbiol.* 37(4): 217-228.
67. Moore D., Odeón A., Campero C. 2001. Neosporosis bovina: una actualización. *Vet Arg* 180(13): 752-775.
68. Moore D., Campero C., Odeon A., Posso M., Cano D., Leunda M., Basso W., Venturini M., Spath E. 2002. Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Vet. Parasitol.* 107:303-316.
69. Moroni M., Navarro M., Paredes E., Romero A., Alberdi A., Lischinsky Uzal, F. 2018. Identification of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses of Southern Chile. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology.* 11(2): 37-41.

70. Nazir M., Ayaz M., Ahmed N., Maqbool A., Ashraf K., Oneeb M., Sajid M. 2018. Prevalence of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and Sarcocystis Species DNA in the Heart and Breast Muscles of Rock Pigeons (*Columbia livia*). Journal of parasitology research.
71. Okeoma C., Williamson N., Pomroy W., Stowell K., Gillespie L. 2004. The use of PCR to detect *Neospora caninum* DNA in the blood of naturally infected cows. Veterinary parasitology. 122(4): 307-315.
72. Ortega-Mora L., Collantes E., Alvarez G. 2001. La Neosporosis del ganado bovino: una enfermedad emergente. Rev. Ciencias Vet. Lima. 17:7-14.
73. Ortega-Mora L., Fernández-García A., Gómez-Bautista M. 2006. Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. Acta Parasitol. 51(1): 1-14.
74. Pabón M., López-Gatius F., García-Ispierto I., Bech-Sàbat G., Nogareda C., Almería S. 2007. Chronic *Neospora caninum* infection and repeat abortion in dairy cows: a 3-year study. Veterinary parasitology. 147(1-2): 40-46.
75. Packham A., Sverlow K., Conrad P., Loomis E., Rowe J., Anderson M., Marsh A., Cray C., Barr B. 1998. A Modified Agglutination Test for *Neospora caninum*: Development, Optimization, and Comparison to the Indirect Fluorescent-Antibody Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. Clin Diagn Lab Immunol. 5 (4): 467 – 473.
76. Paré J., Thurmond M., Hietala S. 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. Can.J.Vet.Res. 60:133-139.
77. Pereira-Bueno J., Quintanilla-Gozaolo A., Seijas-Carballedo A., Costas E., Ortega-Mora L. 2000. Observational studies in *Neospora caninum* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 30: 906-909.
78. Pfeiffer D., Williamson N., Reichel M., Wichtel J., Teague W. 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. Prev.Vet.Med. 54:11-24.
79. Pinedo K., Chávez A., Rivera H., Pinedo R., Suárez F. 2014. Frecuencia de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en vicuñas (*Vicugna vicugna*) de la sierra central peruana mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA indirecta. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, 25(1): 70-76.
80. Portocarrero M., Pinedo V., Falcón P., Chávez V. 2015. Risk factors associated with the seroprevalence of *Neospora caninum* in naturally infected bovine in the tropical highlands of Oxapampa, Peru. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP). 26(1): 119-126.

81. Pulido M., Diaz A, Andrade R. 2017. Association between reproductive variables and anti *Neospora caninum* antibodies in dairy cattle herds from a Colombian municipality. *Revista Mexicana de ciencias pecuarias*. 8(2): 167-174.
82. Puray N. 2005. Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. Tesis.de Licenciatura.Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. 48 pp.
83. Quevedo J., Chávez A., Rivera H., Casas E. 2003. Neosporosis en bovinos lecheros en dos distritos provincia de Chachapoyas. *Rev. Inv.Vet. Perú*. 14:33-37
84. Rahpaya S., Tsuchiaka S., Kishimoto M., Oba M., Katayama Y., Nunomura Y., Okabayashi, T. 2018. Dembo polymerase chain reaction technique for detection of bovine abortion, diarrhea, and respiratory disease complex infectious agents in potential vectors and reservoirs. *Journal of veterinary science*. 19(3): 350-357.
85. Reichel M., Ayanegui-Alcerreca A., Gondim L., Ellis J.2013. What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle – the billion dollar question *Int. J. Parasitol.* 43: 133-142.
86. Risco V., Fernández A., Ortega Mora L. 2012. Producción in vitro de bradizoítos de *Neospora caninum*.
87. Rivera H., Nelson D., Tabacchi L. 2000. *Neospora caninum* y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del valle de Lima. *Rev Inv Vet Perú*. 11: 1-7.
88. Robayo L., Marín J., Vecino J. 2017. *Neospora caninum*: Biological Relationship with *Toxoplasma gondii* and its Potential as Zoonosis. *Revista MVZ Córdoba*. Vol. 22. Universidad de Córdoba.
89. Rodriguez G. 2009. Neosporosis en la Ganadería Pecuaria en el Perú. Tesis de Médico Veterinario. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.83 p.
90. Rondón I. y Díaz H. 2006 .Aspectos inmunopatológicos de la neosporosis bovina. *Orinoquia*.10 (2): 52–58.
91. Sánchez G., Banda R., Sahagun R., Ledesma M., Morales S. 2009. Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. *Veterinary parasitology*, 164(2-4): 328-332.
92. Sánchez-Castilleja y Rodríguez-Diego J.2018. Identificación de lesiones histológicas coincidentes con *Neospora caninum* en tejido cerebral de fetos bovinos. *Revista de Salud Animal*. 40(1).

93. Sager H., Fischer I., Furrer K., Strasser M., Waldvogel A., Boerlin P., Audigé J., Gottstein B, 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol.* 102: 1–15.
94. SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria). 2011. Proyecto: Fortalecimiento del sistema de vigilancia zoonosario. Informe final: Caracterización de la Diarrea Viral Bovina, Neosporosis bovina y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Perú. 26 p.
95. Serrano E., Evaristo R., Quispe M., Hinostroza, E. 2018. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de Lima y comparación entre ELISA e IFI. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 29(3): 916-922.
96. Silva S., Chávez A., Rivera G., Casas E. 2002. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú.* 13(2): 51-55.
97. Stenlund S., Kindahl H., Magnusson U., Ugglå A., Björkman C. 1999. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet.Parasitol.* 85:227-234
98. Speer C., Dubey J., McAllister M., Blixt J. 1999. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int.J.Parasitol.* 29:1509-1519
99. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual* Second edition. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbord, New York
100. Sánchez G., Banda R., Sahagun R., Ledesma M., Morales S. 2009. Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. *Veterinary parasitology.* 164(2-4): 328-332.
101. Thurmond M. y Hietala S. 1997. Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first lactation dairy cows. *J.Am.Vet.Med.Assoc.* 210:672-674.
102. Thrusfield M. 2005. *Veterinary Epidemiology*, second ed. London, Black Well Science. 600 pp.
103. Trees A., Davison H., Innes E., Wastling J. 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. *Int.J.Parasitol.* 29:1195-1200.
104. Van Maanen C., Wouda W., Schares G., Von Blumroder D., Conraths F., Norton R., Williams D., Esteban-Redondo I., Innes E., Mattsson J., Bjorkman C., Fernandez-Garcia A., OrtegaMora L., Muller N., Sager H., Hemphill A. 2004. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet. Parasitol.* 126, 351–364.

105. Vargas-Niño A., Vargas R., Parra-Martin J., Vásquez R., Góngora O., Mogollón-Waltero, E. 2018. Serological status of IBR, BVD, leucosis, *Leptospira* and *Neospora caninum* in bovine females of the department of Santander, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 23(2): 6671-6680.
106. Vélez V., Cahuana J., Pérez O. 2013. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos Lecheros en el sector Sama Grande del Distrito de Sama-Inclán, Tacna - Perú. *Revista VERITAS – Universidad Católica de Santa María*. 14:100-104
107. Vega L., Chávez A., Falcón N., Casas E., Puray N. 2010. Prevalencia de *Neospora caninum* en perros pastores de una empresa ganadera de la sierra sur del Perú. *Rev. Invest. Vet.*, 21:80-86.
108. Wilson, D., Orsel K., Waddington J., Rajeev M., Sweeny A., Joseph T., Raverty S. 2016. *Neospora caninum* is the leading cause of bovine fetal loss in British Columbia, Canada. *Veterinary parasitology*, 218: 46-51.
109. Wouda W., Dubey J., Jenkins M. 1997. Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. *J.Parasitol.* 83:545-547.
110. Wouda W., Bartels C., Moen A. 1999. Characteristics of *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology* 52:233-245.

ANEXO 1. Ficha de recolección de datos empleados en el estudio.

COD: _____

Establo

Número de animales:
Fecha de muestreo
Numero de Bovinos
Presencia de perros
Número de perros
Presencia de otros hospederos intermediarios
Porcentaje de mortalidad (anual) :
Animal
Nombre:
Sexo:
Edad fetal:
Procedencia de los fetos abortados:
Antecedentes de aborto:
FECHA :

ANEXO 2. Datos de las progenitoras basadas en información obtenida del proyecto.

Madre	Procedencia	# Partos	Edad	Antecedentes aborto	ELISA
1	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
2	Lima norte	primeriza	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
3	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
4	Lima norte	primeriza	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
5	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
6	Lima norte	multíparas	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
7	Lima norte	primeriza	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
8	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Negativo
9	Lima norte	primeriza	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
10	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
11	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
12	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
13	Lima norte	multíparas	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
14	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
15	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
16	Lima norte	primeriza	de 2 a 4 años	abortaron	Negativo
17	Lima norte	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
18	Lima norte	primeriza	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
19	Lima norte	primeriza	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
20	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
21	Lima sur	multíparas	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
22	Lima sur	multíparas	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
23	Lima sur	multíparas	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
24	Lima sur	multíparas	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
25	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
26	Lima sur	primeriza	15 a 24 meses	abortaron	Positivo
27	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
28	Lima sur	primeriza	15 a 24 meses	abortaron	Positivo
29	Lima sur	multíparas	de 2 a 4 años	abortaron	Negativo
30	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Negativo
31	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
32	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
33	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
34	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
35	Lima sur	multíparas	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
36	Lima sur	multíparas	de 2 a 4 años	abortaron	Positivo
37	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
38	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
39	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo
40	Lima sur	multíparas	mayores de 4 años	abortaron	Positivo