



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACIÓN DE FACTORES DE RIESGO Y MEDIDAS
PREVENTIVAS PARA LA INFECCIÓN POR *Neospora caninum* EN
GANADO BOVINO LECHERO DE PEQUEÑOS PRODUCTORES
APOYADOS POR EL INSTITUTO DE DESARROLLO
AGROPECUARIO DE LA REGIÓN DEL LIBERTADOR GENERAL
BERNARDO O'HIGGINS.**

Alan Nicolás Lavado Avilés

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: CHRISTOPHER HAMILTON-WEST
Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE
2015

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Primero que todo quiero agradecer y dedicar todo este trabajo a mi familia, a mis padres, José Lavado Cerda y María Eugenia Avilés Rivera, que son lo más importante que me ha dado la vida, son mi apoyo y guías más importantes.

Agradezco a mi profesor guía, Dr. Christopher Hamilton-West, por considerarme en este proyecto y por todo el tiempo invertido, como también agradezco la ayuda y el apoyo de su señora, la Dra. Dácil Rivera, con quien realicé varias salidas a terreno.

A Francisca Di Pillo del Departamento de Medicina Preventiva Animal, por su ayuda en el análisis estadístico y el ánimo entregado.

A mis profesores correctores el Dr. Fernando Fredes y Dr. Pablo Hervé y al Dr. José Pizarro, Director del Departamento de Medicina Preventiva Animal por todo el apoyo en mi proceso de titulación.

De manera especial, quiero dedicar esta Memoria de Título a mi abuelita Olivia, a quien amo mucho.

ÍNDICE

RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	7
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
Antecedentes	8
Ciclo biológico y hospederos.....	8
Patogenia.....	10
Diagnóstico	11
Tratamiento	11
Situación nacional.....	12
OBJETIVO GENERAL.....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Toma de muestras	15
Diagnóstico	16
Interpretación de los resultados	18
Identificación de los factores de riesgo.....	18
Análisis de los datos	19
RESULTADOS	22
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXO 1	40
ANEXO 2	41
ANEXO 3	42
ANEXO 4	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número total de vacas muestreadas según predio y comuna correspondiente.	15
Tabla 2. Variables estudiadas para determinar los factores de riesgo asociados a la seropositividad a <i>N. caninum</i>	21
Tabla 3. Vacas en lactancia muestreadas y seropositividad a <i>N. caninum</i> según predio.....	22
Tabla 4. Variables consideradas en el análisis de Regresión Logística univariado.....	23
Tabla 5. Resultado de factores de riesgo asociados a la presencia de serología positiva de anticuerpos para <i>N. caninum</i> en bovinos lecheros.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i> considerando al bovino como hospedero intermediario y al perro como hospedero definitivo del ciclo.	10
Figura 2. Ubicación geográfica de los predios muestreados en el estudio	14
Figura 3. Obtención de muestra de sangre de una vaca por venopunción de la vena coccígea con sistema Vacutainer ®.	16
Figura 4. Placa kit IDEXX® <i>Neospora X2</i>	18

RESUMEN

Se realizó un estudio transversal para determinar la tasa de animales seropositivos a la infección por *Neospora caninum* y su asociación a factores de riesgo en predios de pequeños productores de leche, asociados al programa de Servicio de Asesoría Técnica (SAT) del Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP), ubicados en la Región del Libertador Bernardo O'Higgins. Se evaluaron 45 sueros de vacas en período de lactancia de 9 predios y se determinó la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en 18 sueros utilizando la técnica de *Enzyme Linked Support-Assay* (ELISA). Se aplicó una encuesta cerrada a los productores de cada predio para caracterizar los potenciales factores de riesgos intrínsecos y extrínsecos de la infección. Posteriormente se calculó el nivel de asociación a *N. caninum* para cada variable estadísticamente significativa ($P < 0,05$) mediante un modelo de regresión logística univariado con el programa InfoStat® versión 2014. Los factores de riesgo con asociación estadística fueron: el historial de aborto (OR = 5,09), el tipo de alimentación de los perros del predio (OR = 6), el consumo de agua desde acequias (OR = 4,5) y el manejo del material biológico de partos y abortos (OR = 7,43).

Este trabajo evidenció la importancia de la transmisión horizontal y el rol del perro en la infección con *N. caninum*, por lo que frente a este hecho sería trascendental trabajar en medidas de tenencia responsable de las mascotas con los productores propietarios de perros. Frente a la transmisión vertical la principal medida es mantener un registro de cada vaca, sobre todo frente a eventos de abortos. Además, se debe considerar la reposición de animales seropositivos a *N. caninum* y que hayan cursado con abortos, siempre complementando estas medidas con mejoras en la bioseguridad de las instalaciones.

Palabras claves: *Neospora caninum*, factores de riesgo, serología, regresión logística, aborto bovino, perros.

ABSTRACT

A cross-sectional study was conducted to determine the rate of seropositive animals to *Neospora caninum* infection and its association with risk factors in farms of small milk producers associated to the program Servicio de Asesoría Técnica (SAT) of the Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP), located in the Libertador Bernardo O'Higgins region, Chile. 45 breastfeeding cows were evaluated of 9 properties to determine the presence of antibodies against *N. caninum* in 18 sera using the Enzyme Linked Support-Assay (ELISA) technique. A survey was applied to the producers of every farm to characterize the potential intrinsic and extrinsic risk factors. Afterwards the association level to *N. caninum* to each variable significantly associated ($P < 0,05$) was calculated under logistic regression model with the software InfoStat 2014. Risk factors with statistical association were: history of abortion (OR = 5, 09), dogs feed (OR = 6), water consumption from ditch (OR = 4, 5) and handling of biological material deliveries and abortions (OR = 7, 43).

This work demonstrates the importance of horizontal transmission and the role of the dog in *N. caninum* infection, so it would be important to work with the dog owners on how to improve the animal responsible ownership. Against vertical transmission, the main measure is to keep record of each cow, especially animals with abortions. In addition, producers should consider replacement of animals with positive serology to *N. caninum* and history of abortion, always complementing these measures with biosecurity improvements.

Keywords: *Neospora caninum*, risk factors, serology, logistic regression, bovine abortion, dogs.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción bovina, los problemas reproductivos implican pérdidas económicas sin discriminación entre grandes o pequeños productores. Existen varias causas para este tipo de problemas, como agentes infecciosos, factores nutricionales y otros propios del manejo. Solo hace un par de décadas se ha asociado al parásito protozooario intracelular *Neospora caninum* como causa de aborto en varias zonas del mundo, siendo en algunos países ganaderos, reconocido como el principal agente abortivo bovino.

En Chile los primeros registros de *N. caninum* corresponden a trabajos del año 1999, por lo que su detección en la ganadería nacional de leche y carne son recientes. Estudios posteriores han descrito de mejor manera la situación local, pero la magnitud del problema aún se desconoce debido a la falta de diagnóstico y el poco uso de registros productivos y reproductivos oficiales o privados. Tanto a nivel internacional como nacional, existen falencias en el conocimiento de la situación epidemiológica de la neosporosis, principalmente en lo relacionado a la prevalencia de la infección y su relación con los potenciales factores de riesgo.

Un aspecto importante en la infección por *N. caninum* es la ausencia de tratamientos económicamente viables y efectivos para su control o prevención farmacológica, por esto muchos de los trabajos se centran en determinar los factores de riesgo para la presentación de la infección, y a través de estos estudios epidemiológicos de la enfermedad se ha logrado describir medidas preventivas, limitando el ciclo parasitario, mediante manejos de bioseguridad. En la actualidad hay avances en el desarrollo de vacunas contra la neosporosis con resultados alentadores.

Frente a la situación planteada, esta Memoria de Título propone generar información sobre la asociación entre el diagnóstico serológico de la neosporosis bovina, los factores de riesgo propuestos por la literatura y los que se encuentran en los predios, pertenecientes al programa Servicio de Asesoría Técnica, Unidad Ganadera, dependiente del Instituto de Desarrollo Agropecuario en las comunas de Rengo, Las Cabras, Quinta de Tilcoco, Malloa y Peralillo de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Antecedentes

Neospora caninum es un parásito protozoario de reciente descripción. En 1984 se describe por primera vez, como similar a *Toxoplasma gondii*, en seis cachorros con alteraciones neurológicas y en 1988 se propone y describe el nuevo género y especie de protozoo tras identificar un parásito similar, en 10 perros con síntomas neuromusculares (Dubey *et al.*, 1988; Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011).

A pesar de ser descrito inicialmente en perros, este parásito toma mayor relevancia al identificarse como agente etiológico de aborto y problemas reproductivos en bovinos (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 2003; Dubey y Schares, 2011).

La enfermedad causada por *N. caninum* se denomina neosporosis y se ha descrito en todo el mundo (Dubey, 2003). Los registros en Sudamérica datan de la última década, de estudios desarrollados en Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay (Moore, 2005). En Chile se describe la infección por primera vez en 1999, registrándose tanto en la población canina como en el ganado lechero (Meléndez *et al.*, 1999; Patitucci *et al.*, 1999; Patitucci *et al.*, 2000; Patitucci *et al.*, 2001; Fredes, 2002).

Taxonomía

Actualmente la clasificación taxonómica de *Neospora* se incluye en el Phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y Familia Sarcocystidae (Dubey y Lindsay, 1996), y está estrechamente relacionado a *T. gondii* y otras especies de importancia humana y veterinaria como *Hammondia hammondi* y *Hammondia heydorni*, por su morfología y biología (Dubey, 2003).

Ciclo biológico y hospederos

N. caninum presenta un amplio rango de hospederos, tanto domésticos como silvestres, y su ciclo biológico se realiza mediante transmisión horizontal y vertical (figura 1) (Dubey, 2003; Goodswen *et al.*, 2013). Dentro de los animales domésticos se ha evidenciado presencia de exposición a *N. caninum* en el perro, ganado bovino, cabras, ovejas, caballo, búfalo de agua, liebre parda europea, camello, alpacas y llamas, mientras que en los animales silvestres se ha descrito en el ciervo, antílope, mapache, coyote, zorro, dingo, algunos felinos salvajes, el

rinoceronte y en aves domésticas (Dubey y Lindsay, 1996; McAllister *et al.*, 1998; Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011; Almería, 2013).

En Sudamérica la Zarigüeya común o sudamericana (*Didelphis marsupialis*), el lobo de crin Aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) y otros canidos salvajes (*Cerdocyon thous* y *Lycalopex gymnocercus*) incluyendo 2 zorros de Chiloé (*Pseudolapex fulvipes*) son posibles hospederos de *Neospora* (Patitucci *et al.*, 2001; Moore, 2005; Almería, 2013). De estas especies, perro, coyote, zorro y dingo australiano se describen como hospederos definitivos para el ciclo biológico de *N. caninum* (McAllister *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2007; Dubey *et al.*, 2011).

En la transmisión horizontal, el hospedero intermediario se infecta por vía fecal-oral al consumir alimento o agua contaminada con ooquistes esporulados de *Neospora* (Dubey *et al.*, 2007). En esta etapa se describe una multiplicación rápida con formación de taquizoitos (3-7 x 15 µm) de ubicación intracelular, de preferencia en células nerviosas, y posteriormente una multiplicación lenta con formación de un quiste tisular (100 µm de diámetro aproximadamente) de forma redondeada u oval que puede contener hasta 200 bradizoitos, de 6-8 x 1-1,8 µm cada uno (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 2003; Fernández, 2003). Estos quistes generalmente se ubican en el sistema nervioso central (Montenegro, 2011). El hospedero definitivo se infecta cuando se alimenta de tejidos que contienen quistes tisulares, entonces se lleva a cabo la fase sexual del parásito y se generan ooquistes (10-11 µm de diámetro) que el hospedero elimina al ambiente sin esporular. Los ooquistes pueden esporular en el medio ambiente en 24 horas, cuando existen condiciones favorables de temperatura (22°-37°C) (Lindsay *et al.*, 1999). Si bien la transmisión horizontal es la forma más frecuente de infección, en bovinos una de las principales vías de transmisión y mantención de la infección de *N. caninum* durante generaciones es la vía vertical (Dijkstra *et al.*, 2002; Dubey, 2003).

Se considera que *N. caninum* tiene potencial zoonótico debido a que experimentalmente se ha logrado infectar a 2 monos Rhesus (Ho *et al.*, 1997), sin embargo, estudios en mujeres con abortos reiterados y en grupos de personas con alto riesgo de exposición al agente han demostrado falta de evidencia serológica de *N. caninum* en humanos (Petersen *et al.*, 1999; Mccann *et al.*, 2008). Por lo demás solo se han reportado bajos títulos de anticuerpos en

pacientes con inmunodeficiencia y alteraciones neurológicas (Lobato *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007). Se debe considerar la posibilidad de que sea una infección subdiagnosticada en humanos, al igual que como ocurre con la toxoplasmosis (Tranas *et al.*, 1999).

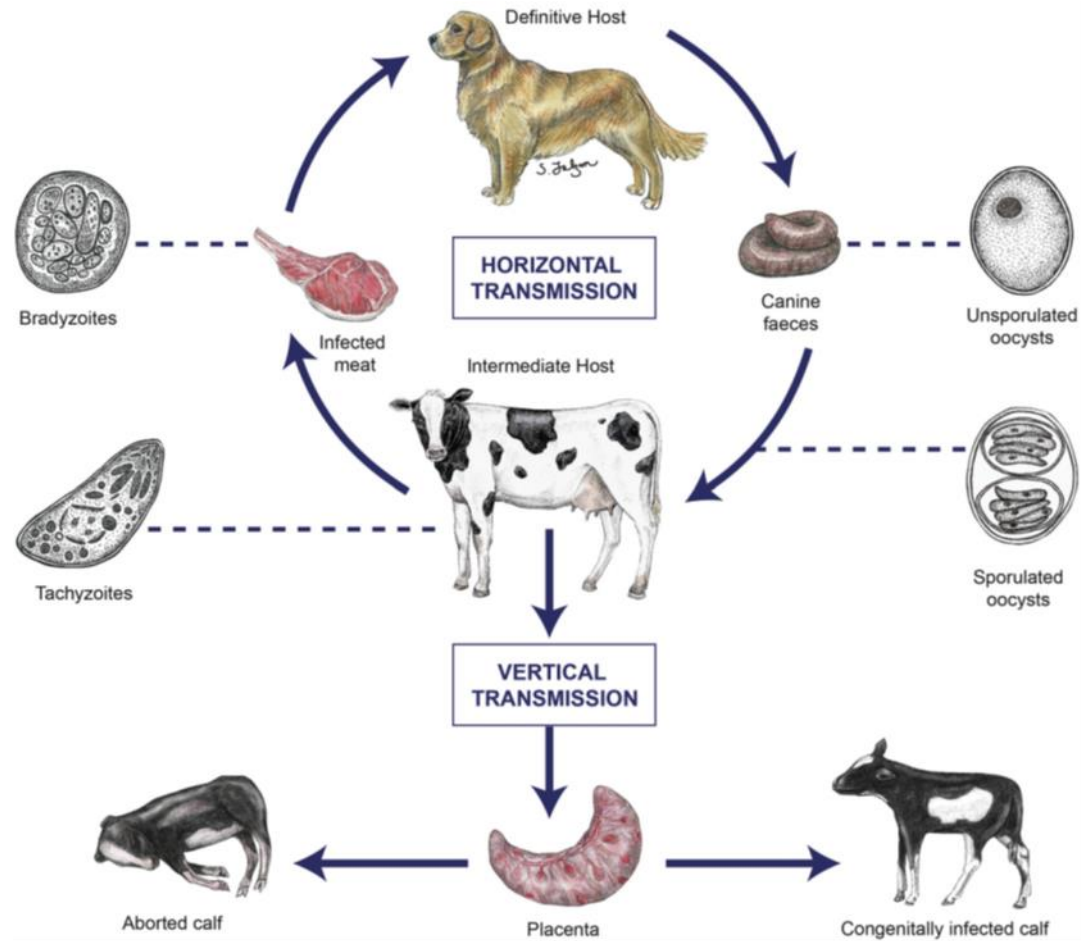


Figura 1. Ciclo biológico de *Neospora caninum* considerando al bovino como hospedero intermediario y al perro como hospedero definitivo del ciclo (Goodswen *et al.*, 2013).

Patogenia

La principal patogenia que produce la infección por *N. caninum*, en vacas, es el aborto y nacimiento de terneros congénitamente infectados (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 2003; Dubey y Schares, 2011). En vacas adultas los abortos son frecuentes en el segundo tercio de la gestación, ya que la inmunidad del feto no está desarrollada por completo (Montejo, 2012). La multiplicación de los tachizoitos en la placenta causaría la destrucción, necrosis e inflamación del tejido maternal y fetal (Fernández, 2003). Cuando la infección de la vaca

ocurre durante el último tercio de la gestación, los terneros pueden presentar síntomas neurológicos y neuromusculares como ataxia, disminución del reflejo patelar, pérdida de la propiocepción y flexión o hiperextensión de los miembros anteriores y/o posteriores (Dubey, 2003). Cabe destacar que la mayoría de las crías nacen sanas y alrededor del 5% son abortadas (Valenzuela, 2005).

Diagnóstico

El diagnóstico de la neosporosis no es sencillo debido a la ausencia de signos clínicos específicos y al escaso número de parásitos presentes en los fetos abortados, por lo que la confirmación de la infección requiere de pruebas diagnósticas de laboratorio. En el caso de animales vivos, el diagnóstico se fundamenta en la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* mediante técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), *Enzyme Linked Support Assay* (ELISA), western-blot (WB) y inmunoaglutinación directa (DAT) (Fernández, 2003). En el caso de los abortos bovinos el diagnóstico se puede realizar mediante histología e inmunohistoquímica, técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), serología de la madre y el feto y aislamiento del protozoo (Fredes, 2002; Valenzuela, 2005).

Las seroprevalencias registradas en estudios cuantitativos en Estados Unidos, Nueva Zelanda, Holanda y Alemania indican que, según el tipo de prueba diagnóstica usada, 12-42% de los fetos abortados en vacas de lechería están infectados con *N. caninum* (Dubey, 2003), y se describe que el riesgo de abortar de una vaca infectada es de 3 a 7 veces mayor que en las no infectadas (Innes *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2003)

Tratamiento

La condición cosmopolita de la infección y las consecuencias económicas en los sistemas productivos bovinos justifica el desarrollo de tratamientos efectivos, pero también económicamente viables en la práctica diaria. Estudios actuales sobre tratamientos quimioterápicos en bovinos han desarrollado información sobre la sensibilidad *in vitro* de *N. caninum* a ciertos antibióticos, demostrando que la clindamicina tiene la mayor actividad sobre los taquizoitos. Otros estudios se han basado en el uso de toltrazuril y/o sulfadiazina y trimetoprim, disminuyendo los abortos y seroprevalencias, siempre que sean acompañados de manejos sanitarios del animal y del predio como de los factores de riesgo de la infección

(Cuteri *et al.*, 2005); sin embargo aún no existe un tratamiento capaz de combatir la enfermedad en bovinos que elimine las formas quísticas tisulares y que no involucre altos costos.

La evaluación de vacunas inactivadas han demostrado seguridad, pero baja eficacia y no previenen la transmisión vertical. Sin embargo, se reconocen como una opción viable en los sistemas productivos con seroprevalencias mayor al 20% (Reichel y Ellis, 2009). Las vacunas con parásitos vivos generan protección contra la transmisión vertical y el aborto, pero producen infección crónica en el animal (Fernández, 2003).

Debido a la falta de opciones para el control terapéutico de la neosporosis, es importante reconocer los potenciales factores de riesgo, para manejarlos como medida preventiva, es decir, actuar sobre condiciones de manejo o bioseguridad que limiten el ciclo parasitario. La presencia de perros en el predio, el tipo de explotación ganadera, antecedentes del aborto, el conocimiento de las enfermedades concomitantes y los factores inmunodepresores son los factores de riesgo que más se han descrito (Sierra *et al.*, 2011).

Situación nacional

En Chile existe evidencia serológica de neosporosis en vacas de la zona central (Meléndez *et al.*, 1999) y zona sur (Patitucci *et al.*, 1999; Patitucci *et al.*, 2000), así también como en perros (Patitucci *et al.*, 2001; Pérez, 2009; Rolack, 2012; Latorre, 2013) y dos zorros nativos (Patitucci *et al.*, 2001; Almería, 2013), además de caballos de la zona sur (Patitucci *et al.*, 2004). Sin embargo, no se ha aislado el agente. Las denuncias de aborto registradas por el subdepartamento de vigilancia epidemiológica del SAG, entre los años 2006 a 2011, indican que el 29% de las hembras afectadas presentaron anticuerpos contra *N. caninum* (BVO, 2011). Sería de gran valor desarrollar estudios epidemiológicos para determinar prevalencias nacionales o locales y describir los factores de riesgo asociados al sector ganadero.

El desarrollo de esta Memoria de Título pretende identificar la presencia de anticuerpos para *N. caninum* en vacas de pequeños productores lecheros de la zona central del país asociados al programa Servicio de Asesoría Técnica (SAT) Unidad Ganadera del Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP).

OBJETIVO GENERAL

Determinar factores de riesgo y generar una propuesta de medidas preventivas para la infección con *N. caninum* en ganado bovino lechero de productores asociados al programa de Servicio de Asesoría Técnica (SAT) Unidad Ganadera del Instituto de Desarrollo Agropecuario (INDAP), en la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Identificar la infección a *N. caninum* en bovinos de predios de pequeños productores de la zona central pertenecientes al programa SAT de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins.
- 2.** Caracterizar factores de riesgo para la infección por *N. caninum* en bovinos de predios de pequeños productores de la zona central pertenecientes al programa SAT de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins.
- 3.** Proponer medidas de prevención para disminuir la infección a *N. caninum* en bovinos de predios de pequeños productores de la zona central pertenecientes al programa SAT de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, en predios con bovinos de aptitud lechera pertenecientes a las comunas de Rengo, Malloa, Las Cabras, Quinta de Tilcoco y Peralillo (figura 2). En total se consideraron 9 predios de las diferentes comunas mencionadas, todos integrantes del programa de Servicio de Asesoría Técnica (SAT) Unidad Ganadera del INDAP en dicha región. Este programa está destinado a pequeños productores del rubro agropecuario, y funciona mediante asesorías técnicas conducidas por consultores, en este caso Pro Agro Consultores. Los programas SAT tienen como objetivo mejorar la productividad, contribuir al aumento de la calidad y a la agregación de valor de los productos de los usuarios, además de facilitar la articulación con otros programas de fomento que busquen mejorar la competitividad, uso sustentable de los recursos naturales y el acceso a mercados. Los usuarios acceden a una asesoría técnica permanente y especializada en los ámbitos de acción requeridos por el negocio (Instituto de Desarrollo Agropecuario, 2014).



Figura 2. Ubicación geográfica de los predios muestreados en el estudio. Comuna de Rengo (1), Malloa (2), Las Cabras (3), Quinta de Tilcoco (4) y Peralillo (5).

Toma de muestras

El estudio consideró tomar muestras solo de vacas en período de lactancia, ya que representan un grupo de riesgo y pueden presentar signos de la infección. Se colectaron 45 muestras correspondientes a todas las vacas en lactancia de los predios en estudio durante el período de julio a septiembre de 2014, detallando el total de muestras por predio y comuna en la tabla 1.

Tabla 1. Número total de vacas muestreadas según predio y comuna correspondiente.

Predio	Comuna	Muestras
A	Malloa	13
B	Malloa	5
C	Quinta de Tilcoco	2
D	Malloa	3
E	Malloa	3
F	Rengo	4
G	Las Cabras	8
H	Las Cabras	2
I	Peralillo	6
TOTAL		45

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción de la vena coccígea o caudal con equipo Vacutainer® almacenando cada muestra en tubos para muestras de 4 mL sin aditivos anticoagulantes (figura 3). Cada muestra se rotuló individualmente con la secuencia numérica del Dispositivo de Identificación Individual Oficial (DIIO), fecha, lugar de muestreo y nombre del productor, para la correcta identificación. Cada tubo de sangre obtenido en terreno se mantuvo en frío hasta la refrigeración (4°C) en el Laboratorio Centralizado de Investigación Veterinaria (LaCIV), de FAVET.

Para la obtención del suero se centrifugaron los tubos de sangre por 15 minutos a 2.500 revoluciones por minuto y 4°C. El suero recolectado se colocó en tubos Eppendorf de 0,5 mL, debidamente etiquetados e identificados y se mantuvieron congelados a -20°C hasta su análisis.



Figura 3. Obtención de muestra de sangre de una vaca por venopunción de la vena coccígea con sistema Vacutainer ®.

Diagnóstico

El suero se sometió a una prueba de ELISA para su diagnóstico, con un kit comercial IDEXX *NeosporaX2*® (IDEXX® Laboratorios, Inc., Westbrook, Maine, USA) que detecta anticuerpos IgG específicas de *N. caninum* en suero bovino con una sensibilidad de 98,6% y especificidad 98, 8% de acuerdo con el fabricante, siguiendo el procedimiento recomendado por el mismo.

Cada kit posee:

- 2 placas con 96 pocillos tapizados con antígenos de *Neospora*.
- 1 x 3mL Control Positivo – suero bovino anti-*Neospora* diluido; conservado con azida de sodio.
- 1 x 3mL Control Negativo – suero bovino no reactivo a *Neospora* diluido; conservado con azida de sodio.
- 1 x 30mL Conjugado – conjugado anti-bovino IgG: HRPO; conservado con kathon.

- 1 x 235mL Diluyente de la muestra – solución tampón; conservado con azida de sodio.
- 1 x 60mL Sustrato Tetrametilbencidina (TMB)
- 1 x 60mL Solución de Frenado de 60mL
- 1 x 235mL Concentrado de Lavado (10x) – solución fosfato/Tween 10x; conservado con gentamicina.

Los materiales usados en el laboratorio fueron los siguientes:

- Micropipetas ($\pm 5\%$) para dispensar 5 μL , 100 μL y 500 μL .
- Puntas de pipetas desechables.
- Probeta graduada de 500mL para la solución de lavado.
- Espectrofotómetro.
- Agua destilada.
- Dispositivo para dispensar y aspirar la solución de lavado.

Las muestras en este estudio se trabajaron en duplicado, por lo que 1 placa alcanzó para 45 sueros, el suero control positivo y control negativo.

La preparación de las muestras consistió en diluir las muestras de suero en una razón de 1:100 con el diluyente para muestra, los pocillos de la placa se llenaron con las muestras de suero y los sueros controles. La placa se incubó en reposo con las muestras de suero por 30 minutos a una temperatura de 25°C. Posteriormente se aspiró el líquido de los pocillos, desechando el material que no se ligó, se lavó cada pocillo 4 veces con 300 μL de solución de lavado, aspirando el líquido de los pocillos después de cada lavado, y se vertió 100 μL de conjugado en cada pocillo. Nuevamente se incubó la placa en reposo durante 30 minutos a 25°C y se repitieron los pasos de aspirar el material no ligado y lavar con solución de lavado.

Para poder realizar la lectura de la placa se aplicó 100 μL de un cromógeno (Solución Substrato TMB), en cada pocillo de la placa, se incubó en reposo por 15 minutos a 25°C y se frenó la reacción con 100 μL de Solución de Frenado en cada pocillo. El cromógeno añadido

da la coloración a la muestra reaccionante, que es proporcional a la cantidad de anticuerpo en la muestra (figura 4).

Se registró la absorbancia de cada muestra con un espectrofotómetro a 650 nm. Los resultados obtenidos en el espectrofotómetro fueron evaluados mediante las ecuaciones descritas en el kit IDEXX® (anexo 1) y para la interpretación de cada resultado se aplicaron las condiciones de positividad y negatividad presentes en el instructivo.

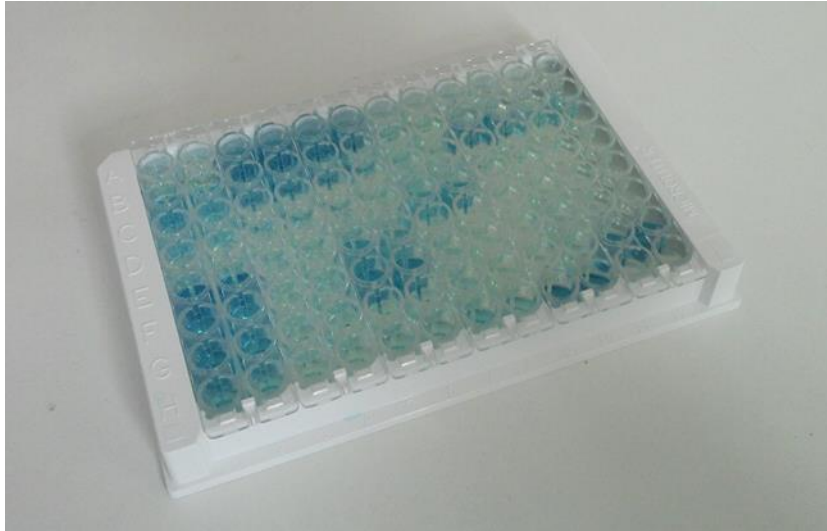


Figura 4. Placa kit IDEXX® *Neospora* X2. Algunos recipientes se han tornado de color azul al reaccionar con el cromógeno que se liga al anticuerpo Anti-*Neospora caninum* presentes en cada suero.

Interpretación de los resultados

1. Las muestras de suero con cocientes M/P menores que 0,50 se clasifican como NEGATIVOS a la presencia de anticuerpos anti *Neospora*.
2. Si el cociente M/P es mayor o igual que 0,50, las muestras se clasifican como POSITIVOS a la presencia de anticuerpos anti *Neospora*.

Identificación de los factores de riesgo

Para identificar los potenciales factores de riesgo se realizó una encuesta (anexo 2). El desarrollo de ésta se realizó a partir de información recopilada sobre los factores de riesgo para la neosporosis bovina, descritos en publicaciones anteriores (Hobson *et al.*, 2005;

Corbellini *et al.*, 2006; VanLeeuwen *et al.*, 2010; Aguiar *et al.*, 2011; Sierra *et al.*, 2011). La encuesta se desarrolló de forma presencial y concentró 28 variables clasificadas en cuatro categorías (tabla 2): 1) población animal, 2) factores productivos, 3) factores ambientales y 4) factores sanitarios.

Previo al análisis se creó una base de datos en Microsoft Excel® 2013 con las respuestas a la encuesta, y se seleccionaron las variables que tuvieron una variabilidad mayor al 20% en sus respuestas.

Análisis de los datos

Se calculó el porcentaje de animales seropositivos a *N. caninum*, con su intervalo de confianza al 95% (IC95%), mediante las fórmulas:

$$\text{Porcentaje animales seropositivos} = \frac{\text{sueros positivos a } N. \text{ caninum}}{\text{número total de sueros analizados}} \times 100$$

$$IC95\% = \rho \pm 1,96\sqrt{[\rho(1 - \rho)]/n}$$

Para estimar la asociación entre la seropositividad a *N. caninum* y cada una de las variables (potenciales factores de riesgo) se utilizó el software InfoStat® versión 2014 bajo un modelo de regresión logística univariada. La regresión logística es una herramienta que se utiliza cuando se desea conocer como una serie de factores influyen en una variable dependiente cualitativa o categórica dicotómica. Esta situación es muy frecuente, ya que muchas veces en la investigación epidemiológica se desea identificar los predictores de la ocurrencia de un determinado fenómeno (que ocurra un suceso o no ocurra). Todas las variables que son candidatas a predecir la ocurrencia de ese fenómeno se utilizarían como variables independientes en el modelo de regresión logística (Martínez *et al.*, 2006). Para una respuesta binaria, el modelo de regresión logística simple, es decir con una variable regresora, presenta la siguiente fórmula:

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta\chi_i$$

Donde p es la probabilidad de éxito dado X_i , α es la ordenada al origen (constante), β es la pendiente o coeficiente de regresión asociado a X , que es la variable explicativa (predictora).

En este estudio la variable dependiente fueron las vacas seropositivas a *N. caninum* y las variables independientes corresponden a los factores de riesgos relacionados con la neosporosis.

La fuerza de asociación entre las variables fue calculada como *Odds ratio* (OR). El OR es conocido como razón de probabilidades, y corresponde al cociente entre la probabilidad de presentar anticuerpos para *N. caninum* en el grupo expuesto al factor de riesgo, y los que no han sido expuestos. Cuando el OR toma valores mayores a 1 ($OR > 1$) indica que la variable es un factor de riesgo, valores OR menores a 1 ($OR < 1$) la variable es un factor de protección y cuando OR es igual a 1 ($OR = 1$), no hay diferencias entre las dos categorías analizadas.

Los resultados del diagnóstico serológico serán entregados de manera privada a cada productor, con la propuesta de pautas de manejo y medidas preventivas, de manera de disminuir la exposición al parásito. Adicionalmente, junto con Pro Agro Consultores, se desarrollará una reunión con los productores usuarios del programa SAT del INDAP para el conocimiento colectivo de la enfermedad y así evitar la alarma entre los productores frente a una enfermedad que es poco conocida. Complementariamente, se realizará una charla de actualización frente a la neosporosis para los médicos veterinarios de Pro Agro Consultores.

Tabla 2. Variables estudiadas para determinar los factores de riesgo asociados a la seropositividad a *N. caninum*.

Ítem	Variable
Factores propios del animal	Edad Raza Historial de aborto Repeticiones de celo Gestaciones Tipo de encaste
Factores productivos	Reposición de animales Objetivo productivo
Factores ambientales	Perros en el predio (propios/ajenos), cantidad, fuente de alimentación, acceso a material de partos/abortos, acceso de perros a fuente de agua y alimento de bovinos Origen de perros ajenos (con dueño/vagos) Presencia de otros animales en predio (aves de corral, caballos, gatos, otros) Acceso a sombra Fuente de agua de bovinos Tipo de terreno
Factores sanitarios	Predio libre de TBC, Leucosis y Brucelosis Realiza desparasitación Manejo de material de partos/abortos

RESULTADOS

En el presente estudio realizado en los predios de cinco comunas de la Región del Libertador General Bernardo O'Higgins, se determinó que en 6 de 9 predios se presentó al menos un caso positivo de anticuerpos contra *N. caninum*, lo que corresponde al 55,6% de los predios estudiados.

Se obtuvieron 45 muestras de hembras en período de lactancia, entre todos los predios, alcanzando un porcentaje de seropositividad del 40% \pm 14,3% (18/45), además el promedio de la seropositividad de cada predio alcanzó un 37% (tabla 3).

Tabla 3. Vacas en lactancia muestreadas y seropositividad a *N. caninum* según predio.

Predio	Número animales muestreados	Vacas seropositivas a <i>N. caninum</i>	%
A	13	7	54
B	5	2	40
C	2	0	0
D	3	0	0
E	3	0	0
F	4	3	75
G	7	2	29
H	2	2	100
I	6	2	33
TOTAL	45	18	37

Las variables que se consideraron para el análisis de regresión logística son las presentadas en la tabla 4. De éstas, las que presentaron significancia estadística ($P < 0,05$) y que se identificaron como factores de riesgo para infección por *N. caninum* corresponden a: 1) el historial de abortos de cada vaca en período de lactancia ($P: 0,037 - O.R: 5,09$); 2) el tipo de alimentación de los perros en los predios ($P: 0,0429 - O.R: 6$); 3) el consumo de agua desde acequias ($P: 0,0334 - O.R: 4,5$), finalmente, 4) el manejo sanitario de los restos de partos/abortos en el predio ($P: 0,0174 - O.R: 7,43$) (tabla 5). Mientras que las variables que no se consideraron en el análisis de la encuesta fueron: 1) el objetivo productivo, ya que todos

los predios son productores de leche; 2) las repeticiones de celo en las vacas (considerando hasta un año atrás) por la poca variabilidad en las respuestas; 3) el acceso a sombra y 4) los manejos sanitarios (realización de desparasitaciones, condición de predio libre de tuberculosis, leucosis y brucelosis) tampoco fueron consideradas para el análisis estadístico ya que en el 100% de los predios se cumplían estas condiciones, haciendo imposible el análisis de esta información en el estudio.

Para el resto de las variables descritas no fue posible demostrar asociación con la seropositividad a *N. caninum*.

Tabla 4. Variables consideradas en el análisis de Regresión Logística univariado.

Variable	Clasificación
Edad	E1: < 3 años; E2: 3-6 años; E3: ≥ 7
Raza	R1: Holstein; R2: Jersey; R3: H X J
Historial de aborto	1: Si; 0: No
Gestaciones	G1: ≤ 2 ; G2: 3-5; G3: ≥ 6
Tipo de encaste	1: Inseminación; 0: Monta natural
Reposición	1: Propia; 0: Compra
Perros	1: Si tiene; 0: No tiene
Número de perros	P1: 0; P2: 1-3; P3: ≥ 4
Alimentación perros	C1: Extruido comercial; C2: Comida casera; C3: No aplica
Origen de los perros	C: Conocidos; D: Desconocidos; NA: No Aplica
Perros con acceso a material de partos/aborto	1: Si tiene acceso; 0: No tiene acceso
Perros con acceso a agua de bovinos	1: Si tiene acceso; 0: No tiene acceso
Perros con acceso a alimento bovinos	1: Si tiene acceso; 0: No tiene acceso
Presencia de aves en predio	1: Existen aves de corral en el predio; 0: No hay aves.
Presencia de caballos en predio	1: Existen caballos en el predio; 0: No hay caballos.
Presencia de gatos en predio	1: Existen gatos en el predio; 0: No hay gatos.
Presencia de otros animales	1: Existen otros animales; 0: No hay otros animales.
Fuente de agua de bovinos	A1: Pozo; A2: Acequia/Canal; A3: Potable
Tipo de terreno	T1: Normal; T2: Barroso; T3: Inundable
Manejo de placentas/abortos	1: Queda en el predio; 0: Entierra

Tabla 5. Resultado de factores de riesgo asociados a la presencia de serología positiva de anticuerpos para *N. caninum* en bovinos lecheros.

<i>Variable</i>	<i>Categoría</i>	<i>Animales (n)</i>	<i>Odds ratio (CI 95%)</i>	<i>Valor P (< 0,05)</i>
Historial de aborto	Si	10	5,09 (1,10 – 23,49)	0,037
	No	37	Ref.	
Alimento perros	Comida casera	23	6 (1,06 – 34,00)	0,0429
	Acequia/canal	16	4,5 (1,13 – 17,99)	
Fuente de agua bovinos	Nada	34	7,43 (1,42 – 38,78)	0,0174
	Entierra	13	Ref.	

En cuanto al porcentaje de muestras positivas a *N. caninum* por cada variable estudiada, se encontraron los siguientes resultados: 70% (7/10) de las muestras asociadas a historial de aborto fueron positivas a *N. caninum*, 60% (9/15) de las muestras provenientes de vacas que consumen agua de acequias fueron positivas a *N. caninum*, 55% (12/22) de las muestras de vacas que conviven con perros alimentados con comida casera fueron positivos a *N. caninum*, y por último el 53% (16/30) de las muestras de vacas de predios donde no se realizan manejos del material de partos/abortos fue positivo a *N. caninum*.

Los resultados del estudio se presentaron a los productores de la zona el día 21 de enero de 2015, durante el día de campo organizado por Pro Agro Consultores, en la localidad de Chimbarongo, Región del Libertador General Bernardo O'Higgins. En esta actividad, que tuvo por objetivo mostrar los avances del Programa de mejoramiento genético del INDAP, asesorado por Pro Agro Consultores, se logró reunir un total de 110 asistentes. Durante la exposición del presente estudio, se informó a los productores sobre los aspectos generales de la neosporosis bovina, los resultados del estudio, sus medidas de prevención, y se contestaron las preguntas realizadas por los mismos (anexo 3).

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio demostraron un porcentaje de positividad del 40% \pm 14,3% en las 45 vacas estudiadas. Otros estudios en vacas de lechería en Chile describen entre 20 a 50% de prevalencia realizados mediante ELISA e Inmunofluorescencia indirecta (IFAT) (Meléndez *et al.*, 1999; Pattitucci *et al.*, 1999; Pattitucci *et al.*, 2000), aun así los resultados obtenidos demuestran una alta exposición de los animales a *N. caninum* en la zona, donde solo en 3 predios no hubo animales positivos. En Sudamérica se describe un amplio rango de seroprevalencias para bovinos de leche y carne (4,7% – 88,8%), reportándose en promedio un 30% de seroprevalencia para *N. caninum*. A pesar de que estos valores no están lejos de los resultados encontrados en el presente estudio, no son comparables entre sí ya que se usaron diferentes métodos de diagnóstico y diferentes puntos de corte (Moore, 2005) (anexo 4).

De las variables consideradas en el estudio, el historial de aborto de las vacas (hasta un año atrás) resultó ser un factor de riesgo significativo ($P < 0,05$) en asociación con la presencia de anticuerpos contra *N. caninum*, existiendo 5,09 veces más probabilidad de presentar seropositividad a *N. caninum* que en las vacas que no presentan historial de aborto. Diferentes estudios han descrito una asociación significativa entre la presencia de la infección y el aborto, con un riesgo 2 a 3,5 veces superior en vacas seropositivas que en las seronegativas (Davidson *et al.*, 1999; Jensen *et al.*, 1999; Sager *et al.*, 2001) Incluso Montenegro (2011) menciona que madres congénitamente infectadas tienen hasta 7,4 veces más probabilidades de abortar que una vaca no infectada y además permanecen en este estado de por vida. A pesar de esto, es interesante mencionar que se ha descrito que el riesgo de abortar parece disminuir en las gestaciones siguientes y la fertilidad tampoco es afectada posterior a dicho acontecimiento, presentándose un 4-5% de animales que abortan en más de una ocasión (Anderson *et al.*, 1995; Dubey y Lindsay, 1996; Montenegro, 2011). Otras alteraciones reproductivas como las repeticiones de celo también han sido asociadas con la seropositividad a *N. caninum* (Moore *et al.*, 2009; Beck *et al.*, 2010; Sierra *et al.*, 2011; Bruhn *et al.*, 2013), sin embargo en este estudio no se pudo analizar y estimar la asociación entre estas variables, ya que en el 87% de las vacas no existía registro o antecedentes de haber presentado este tipo de alteración.

No fue posible evaluar la asociación entre los manejos sanitarios del predio y la seropositividad a *N. caninum*, porque todos los predios se presentaron libres de tuberculosis, leucosis, brucelosis, y con desparasitaciones al día por parte de Pro Agro Consultores. Se debe considerar que este parásito protozoario puede actuar como agente oportunista y causar abortos bajo condiciones de enfermedad. En Chile, resultados obtenidos de análisis serológicos a *N. caninum* en casos de aborto entre el año 2006 a 2011 muestran que en promedio el 18,5% de los casos de abortos reaccionan solamente a *Neospora*, y un 37,4% cuando se asocia con otros agentes como virus Diarrea Viral Bovina (DVB) y Rinotraqueitis infecciosa Bovina (IBR) o *Leptospira* (SAG, 2012). Meyer (2013) encontró resultados similares en un estudio descriptivo de causas de aborto bovino entre los años 1991 y 2010 en la zona centro-sur de Chile; de las causas infecciosas un 22% de los fetos abortados tuvo lesiones compatibles con *N. caninum*, además en algunos casos (9/57) se identificaron otros agentes patógenos asociados a la causa principal del aborto por *N. caninum*, como virus vDVB, *Leptospira* sp, y en menor frecuencia vIBR y *Pseudomonas* sp. Así mismo, Lertora *et al.*, (2010), en Argentina, reporta que *N. caninum* es responsable de causar 7,3 a 9,9% de abortos, teniendo como principales causas de abortos infecciosos bacterias como *Brucella abortus*, *Campylobacter fetus*, *Escherichia coli* β hemolítico. El control de roedores también se ha descrito que disminuye los riesgos de transmisión de *Neospora*, ya que se reducen los riesgos de leptospirosis y salmonelosis (Reichel *et al.*, 2014). Otros factores inmunodepresores que podrían estar involucrados en el desencadenamiento de la enfermedad son la presencia de micotoxinas en el alimento, el estrés por vacunaciones, las altas temperaturas, y factores de la dieta (Bartels *et al.*, 1999).

En el presente estudio la edad de las vacas y el tipo de reposición de animales no fueron factores estadísticamente significativos ($P > 0,05$) al asociarlo a la seropositividad a *N. caninum*, a diferencia de los resultados encontrados por Romero *et al.*, (2002), Otranto *et al.*, (2003) y Beck *et al.*, (2010). Se ha observado que el riesgo de infección por *N. caninum* incrementa con la edad, pues las vacas tendrían más posibilidades de tener contacto con el parásito, o por reactivaciones de infecciones crónicas debido a factores fisiológicos o de manejo durante la gestación (Romero *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2007; Sierra *et al.*, 2011).

La fuente de agua de las vacas fue una variable estadísticamente significativa, siendo las acequias/canales un factor de riesgo para la infección con el parásito. Entonces, las vacas que

consumen agua de bebida desde acequias tienen 4,5 veces más probabilidades de presentar seropositividad a *N. caninum* en comparación con los animales que consumen agua de pozo, que se describe como factor de protección (OR=0,33), y agua potable. Este resultado es comparable al obtenido por Ould-Amrouche *et al.*, (1999) donde comparó fuentes de agua de pozo, acequias/canal y potable, usadas en la alimentación del ganado, encontrando que el uso de un suministro de agua de acequias/canal para alimentación de los animales puede ser un factor de riesgo para la infección por *N. caninum* en el ganado. Esto nos indica que el agua de bebida se contamina fácilmente con ooquistes de *N. caninum* por contaminación con heces de perros u otros hospederos definitivos, incluso por el viento que disemina los ooquistes y se convierte en una fuente de infección importante a considerar en un plan de control de la enfermedad. Esto ocurre principalmente en predios con presencia de perros domésticos y otros animales que pueden actuar como vectores mecánicos de los ooquistes, como las aves de corral (Sierra *et al.*, 2011).

Trabajos realizados por Hobson *et al.*, (2005), Corbellini *et al.*, (2006) y Vanleeuwen *et al.*, (2010) describen que la presencia de perros en predios ganaderos es un factor de riesgo importante. En esta memoria no se logró determinar una asociación positiva entre la seropositividad a *N. caninum* y la presencia y número de perros al igual que otras publicaciones (Romero *et al.*, 2002; Beck *et al.*, 2010). Incluso Barling *et al.*, (2000) menciona que la presencia de perros en el predio es un factor de protección, porque podría evitar el contacto de perros vagos y animales silvestres con el ganado, reduciendo la exposición a los ooquistes infecciosos.

Por otra parte la alimentación de los perros propios del predio si aparece como un factor de riesgo a considerar, ya que los resultados indican que las vacas tienen mayor riesgo de ser seropositivas (OR=6) en predios con perros alimentados con comida casera, en comparación a las vacas de predios con perros alimentados con extruido comercial. Sería importante revisar con más detalle qué tipo de alimentación están recibiendo los perros domésticos que se alimentan con comida casera, pues en zonas rurales es frecuente que los perros domésticos sean alimentados con restos y vísceras de bovinos o aves de corral, tal como describe Patitucci *et al.*, (2001), donde perros de zonas rurales y urbanas de Temuco alimentados con carne cruda tuvieron mayor riesgo de ser positivos a anticuerpos contra *N. caninum* comparados con los perros que se alimentan en base a concentrados y comida de casa cocida.

Es posible también que los perros ataquen y consuman aves de corral del predio, por falta de alimento u otros hábitos, siendo un factor de riesgo para la infección. A pesar de que en este estudio la presencia de aves de corral en el predio no fue una variable estadísticamente significativa, se ha demostrado que las aves de corral son un hospedero intermediario de *N. caninum* (Costa *et al.*, 2008) y además podrían infectar a los perros a través del consumo de huevos embrionados infectados (Furuta *et al.*, 2007; Mansourian *et al.*, 2009).

En el caso de predios donde no se realiza un correcto manejo sanitario del material biológico de partos y abortos (placentas, fetos abortados), se encontró que las vacas tienen 7,43 veces más probabilidades de infectarse con *N. caninum*, probablemente porque los perros presentes en el predio se alimentan de estas placentas o fetos abortados que pueden contener taquizoitos o quistes tisulares que cumplen la fase sexual del parásito en el perro, liberando posteriormente ooquistes al medio ambiente (Dijkstra *et al.*, 2001; Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2007). Debido a esto siempre se debe alimentar a los perros con alimentos cocidos o con extruidos comerciales, además se debe evitar que consuman otros alimentos por necesidad, cuando hay descuidos de los propietarios en la tenencia de la mascota.

Es importante mencionar que se vio presencia de perros en todos los predios estudiados, sin discriminar entre perros propios o ajenos al predio, con contacto muy cercano entre perros y vacas en el 80% de los predios. Sería interesante realizar estudios serológicos a los perros presentes en los predios para ver su exposición al agente y tener resultados más concluyentes frente a la real condición de los perros en esa zona geográfica y su importancia en la enfermedad, sobre todo en perros con alteraciones nerviosas.

Para finalizar, según orden de relevancia en torno a los resultados obtenidos en esta memoria y a la literatura descrita, se proponen algunas medidas preventivas frente a la neosporosis:

- I. Aplicación de estrategias de educación y promoción de la salud en la población expuesta.
 - a. Se debe recopilar información sobre costumbres, hábitos, creencias, aptitudes y actitudes que prevalecen en la comunidad que contribuyen a que persista la transmisión de la neosporosis bovina en el ganado.

- b. Charlas y reuniones con los productores, que deberían centrarse en los peligros que acarrea la alimentación de los perros con vísceras, carne cruda y restos de placentas o abortos provenientes del ganado del predio.
- c. Elaboración de material educativo (audiovisuales, folletos, afiches, etc.) que mantenga en vigencia el interés de los destinatarios.
- d. Participación comunitaria mediante el fortalecimiento de los sistemas locales, a través de realización de actividades de promoción de la salud.

II. Vigilancia Epidemiológica

- a. Diagnóstico del ganado con serología positiva.
- b. Diagnóstico de perros con serología positiva.
- c. Recopilación y registro de información sobre los casos de neosporosis bovina en la zona, distribución geográfica y comportamiento de la enfermedad. Se deberían realizar encuestas a los productores para registrar:
 - i. casos de abortos y características de estos
 - ii. medidas sanitarias realizadas
 - iii. casos de mortalidad en terneros
 - iv. casos de terneros con signos neurológicos
 - v. tenencia de perros y otros animales.

III. Control Transmisión Vertical (Endógena)

- a. Notificación y separación de vacas con historial de aborto. Para esto se debe mantener un registro de todo animal que aborte y confirmar mediante serología los casos de vacas que hayan abortado.
- b. Reposición de animales que presenten serología positiva e historial de abortos.
- c. No realizar reposición hijas de vacas seropositivas dado su alto riesgo de presentar infección congénita.
- d. Eliminación/venta de animales seropositivos y con historial de abortos.
- e. Pruebas diagnósticas en leche mediante serología hasta 3 veces al año.
- f. Separación de terneros con signos neurológicos (descartar otras enfermedades con estos mismos signos).

- g. Manejo de enfermedades concomitantes: IBR, DVB, Brucelosis, Leptospirosis, y salmonelosis.
- h. Control de roedores, ya que reduce riesgo de leptospirosis y salmonelosis.
- i. Inspeccionar estado del alimento por presencia de micotoxinas que podrían causar inmunodepresión en el ganado reactivando los casos de infección crónica.
- j. Manejo y almacenaje del alimento. Espacio utilizado para almacenar alimento del ganado debe evitar el ingreso de perros que puedan contaminar el alimento.

IV. Control Transmisión Horizontal (Exógena)

- a. Mejoras en instalaciones del predio: cercos del predio, accesos a sala de ordeña y comederos de animales.
- b. Enterrar material biológico proveniente de partos o abortos encontrados en el predio, de esta manera se estará garantizando la higiene y no se permitirá que los perros puedan tener acceso y consumir este tipo de material.
- c. Evitar que exista contacto de los perros con material de bovinos (bovinos muertos, material fetal, placenta, calostro).
- d. Limitar acceso de los perros a zonas de almacenamiento de alimento de las vacas.
- e. Preferir agua de pozo o potable para el consumo de las vacas, ya que las acequias o canales son un factor de riesgo.
- f. Educación sanitaria y tenencia responsable de perros en el predio:
 - i. No tener más perros de los que se pueden criar.
 - ii. Procurar alimentarlos para que no busquen alimento por su cuenta.
 - iii. Alimentarlos con extruido comercial o carnes siempre cocidas.
 - iv. Controlar la natalidad (castración y esterilización) – se controla el acceso de otros perros por reproducción con hembras y escape de los machos desde el predio.
 - v. Mantener control sobre su ubicación (no permitir que vaguen sin vigilancia, ya que pueden infectarse o diseminar la enfermedad).

- vi. Notificación de perros con signos neurológicos.
- vii. Desparasitación preventiva de los perros.
- g. Control de perros vagos (Autoridades responsables, Ley tenencia responsable animal).
- h. Examen serológico a los perros, sobre todo en animales con signos neurológicos (debilidad o parálisis en miembros posteriores, flacidez o atrofia muscular, disfagia y parálisis mandibular).
- i. Desinfección del predio con desinfectantes fenólicos al 1% en agua caliente.
- j. Control de animales que pueden actuar como vectores mecánicos (*e.g.* aves de corral, roedores, gatos y perros).

CONCLUSIONES

Neospora caninum se describe en muchas partes del mundo como la principal causa de aborto en el ganado de leche, causando serias pérdidas económicas, pero en Chile existe una falencia en la investigación sobre la situación nacional de esta infección y su relevancia en el sector productivo.

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se puede concluir que existe una alta tasa de infección en las cinco comunas estudiadas de la Región del Libertador Bernardo O'Higgins. Es importante seguir desarrollando estudios, con una población de estudio mayor, para tener resultados más cercanos a la situación local y nacional actual.

Los factores de riesgo más relevantes asociados a *N. caninum* fueron el historial de abortos, el manejo de material de partos y abortos, la fuente de agua de los bovinos y el tipo de alimentación de los perros presentes en el predio.

La presencia de perros se esperaba fuese significativa como factor de riesgo, pero no hubo asociación con la seropositividad a *N. caninum*.

A pesar de las limitaciones del estudio, este trabajo aporta información relevante sobre la asociación de *N. caninum* y los factores de riesgo, comunes en los predios de leche de pequeños productores de la zona, para la prevención de la infección.

La difusión de la información fue un punto importante en este estudio y se pudo concretar con éxito la exposición de los resultados a los productores de la zona.

BIBLIOGRAFÍA

AGUIAR, D.; LACERDA, D.; ORLANDELLI, R.; MEDINA, A.; AZEVEDO, S.; OKUDA, L.; PITUCO, E. 2011. Seroprevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* in female bovines from the western Sao Paulo state, Brazil. *Arq. Inst. Biol.* 78 (2): 183-189.

ALMERÍA, S. 2013. *Neospora caninum* and Wildlife. [en línea] <<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/947347/>> Barcelona, España. [consulta: 04-10-2014]

ANDERSON, M.; PALMER, C.; THURMOND, M.; PICANSO, J.; BLANCHARD, P.; BREITMEYER, R.; LAYTON, A.; MCALLISTER, M.; DAFT, B.; KINDE, H. 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207 (9): 1206-1210.

BARLING, K.; SHERMAN, M.; 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 (9): 1361-1365.

BARTELS, C.; WOUDA, W.; SCHUKKEN, Y. 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology.* 52 (2): 247-257.

BECK, R.; MARINCULIC, A.; MIHALJEVIC, Z.; BENIC, M.; MARTINKOVIC, F. 2010. Seroprevalence and potential risk factors of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Croatia. *Vet. Archiv.* 80 (2): 163-171.

BOLETÍN VETERINARIO OFICIAL (BVO). 2011. Informe: Síndrome de aborto bovino, 2008-2011. N°14. Servicio Agrícola y Ganadero. Chile. 5 p.

BRUHN, F.; DAHER, D.; LOPES, E.; BARBIERI, J.; DA ROCHA, C.; GUIMARÃES, A. 2013. Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 45 (5): 1093-1098.

- CORBELLINI, L.; SMITH, D.; PESCADOR, C.; SCHMITZ, M.; CORREA, A.; STEFFEN, D.; DRIEMEIER, D.** 2006. Herd-level risk factors for *Neospora caninum* seroprevalence in dairy farms in southern Brazil. *Prev. Vet. Med.* 74 (2): 130-141.
- COSTA, K.; SANTOS, S.; UZEDA, R.; PINHEIRO, A.; ALMEIDA, M.; ARAÚJO, F.; GONDIM, L.** 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 38 (2): 157-159.
- CUTERI, V.; NISOLI, L.; PREZIUSO, S.; ATTILI, A.; GUERRA, C.; LULLA, D.; TRALDI, G.** 2005. Application of a new therapeutic protocol against *Neospora caninum*-induced abortion in cattle: a field study. *J. Anim. Vet. Adv.* 4 (5): 510-514.
- DAVISON, H.; OTTER, A.; TREES, A.** 1999. Significance of *Neospora caninum* in British diary cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int. J. Parasitol.* 29 (8): 1189-1194.
- DIJKSTRA, T.; EYSKER, M.; SCHARES, G.; CONRATHS, F.; WOUDA, W.; BARKEMA, H.** 2001. Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. *Int. J. Parasitol.* 31 (8): 747-752.
- DIJKSTRA, TH.; BARKEMA, H.; EYKSER, M.; HESSELINK, J.; WOUDA, W.** 2002. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet. Parasitol.* 105 (2): 99-104.
- DUBEY, J.; CARPENTER, J.; SPEER, C.; TOOPER, M.; UGGLA, A.** 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192 (9): 1269-1285.
- DUBEY, J.; LINDSAY, D.** 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67 (1-2): 1-59.
- DUBEY, J.** 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.* 41 (1): 1-16.
- DUBEY, J.; SCHARES, G.; ORTEGA, L.** 2007. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20 (2): 323-367.

- DUBEY, J.; JENKINS, M.; RAJENDRAN, C.; MISKA, K.; FERREIRA, L.; MARTINS, J.; KWOK, O.; CHOUDHARY, S.** 2011. Gray Wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 181 (2-4): 382-387.
- DUBEY, J.; SCHARES, G.** 2011. Neosporosis in animals – The last five years. *Vet. Parasitol.* 180 (1-2): 90-108.
- FERNÁNDEZ, E.** 2003. Patogenia de la neosporosis en el feto bovino y en un modelo murino experimental. Tesis Doctor en Ciencias Veterinarias. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. 253 p.
- FREDES, F.** 2002. Algunos antecedentes sobre *Neospora caninum* y Neosporosis. *Monografías Med. Vet.* 22 (1-2): 3-9.
- FURUTA, P.; MINEO, T.; CARRASCO, A.; GODOY, G.; PINTO, A.; MACHADO, R.** 2007. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology.* 134 (14): 1931-1939.
- GONDIM, L.; MCALLISTER, M.; PITT, W.; ZEMLICKA, D.** 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34 (2): 159-161.
- GOODSWEN, S.; KENNEDY, P.; ELLIS, J.** 2013. A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present. 13: 133-150.
- HO, S.; BARR, C.; TARANTAL, F.; LAI, T.; HENDRICKX, G.; MARSH, E.; SVERLOW, W.; PACKHAM, E.; CONRAD, A.** 1997. Detection of *Neospora* from Tissues of Experimentally Infected Rhesus Macaques by PCR and Specific DNA Probe Hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 35 (7): 1740-1745.
- HOBSON, J.; DUFFIELD, T.; KELTON, D.; LISSEMORE, K.; HIETALA, S.; LESLIE, K.; PEREGRINE, A.** 2005. Risk factors associated with *Neospora caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Vet. Parasitol.* 127 (3): 177-188.
- INNES, E.; WRIGHT, S.; MALEY, S.; RAE, A.; SCHOCK, A.; KIRVAR, E.; BARTLEY, P.; HAMILTON, C.; CAREY, I.; BUXTON, D.** 2001. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int. J. Parasitol.* 31 (13): 1523-1534.

INSTITUTO DE DESARROLLO AGROPECUARIO. 2014. Servicio de Asesoría Técnica (SAT). [en línea] <<http://www.indap.gob.cl/programas/servicio-de-asesoria-tecnica-sat>> Santiago, Chile. [consulta: 10-11-14]

JENSEN, A.; BJÖRKMAN, C.; KJELDESEN, A.; WEDDERKOPP, A.; WILLADSEN, C.; UGGLA, A.; LIND, P. 1999. Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 40 (3-4): 151-163.

LATORRE, R. 2013. Determinación de *Neospora caninum* mediante inmunocromatografía, en perros de dos predios lecheros de la provincia de Llanquihue, Chile. Memoria Título Médico Veterinario. Puerto Montt, Chile. Universidad San Sebastián, Facultad de Medicina Veterinaria. 26p.

LERTORA, W.; MOHR, B.; MOSQUEDA, M.; SÁNCHEZ, N. 2010. Detección de *Neospora caninum* en fetos bovinos abortados espontáneamente en el nordeste argentino. *Invet.* 12 (2): 173-182.

LINDSAY, D.; DUBEY, J.; DUNCAN, R. 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 82 (4): 327-333.

LOBATO, J.; SILVA, D.; MINEO, T.; AMARAL, J.; SEGUNDO, G.; COSTA-CRUZ, J.; MINEO, J. 2006. Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin. Vaccine Immunol.* 13 (1): 84-89.

MANSOURIAN, M.; KHODAKARAM-TAFTI, A.; NAMAVARI, M. 2009. Histopathological and clinical investigations in *Neospora caninum* experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. *Vet. Parasitol.* 166 (3): 185-190.

MARTÍNEZ, M.; SÁNCHEZ, A.; LÓPEZ, C. 2006. Introducción a los modelos multivariados. In: Martínez, M.; Sánchez, A.; Faulín, F. *Bioestadística amigable*. 2a ed. Díaz de Santos. Madrid, España. pp. 685-753.

MCALLISTER, M.; DUBEY, J.; LINDSAY, D.; JOLLEY, W.; WILLS, R.; MCGUIRE, A. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28 (9): 1473-1479.

MCCANN, C.; VYSE, A.; SALMON, R.; THOMAS, D.; WILLIAMS, D.; MCGARRY, J.; PEBODY, R.; TREES, A. 2008. Lack of Serologic Evidence of *Neospora caninum* in Humans, England. *Emerg. Infect. Dis.* 14 (6): 978-980.

MELÉNDEZ, P.; CONCHA, C.; DONOVAN, A.; BJORKMAN, C. 1999. Evidencia serológica de *Neospora caninum* en un rebaño lechero de la zona central de Chile. *Avances en Ciencias Veterinarias.* 14 (1-2): 13-16.

MEYER, L. 2013. Estudio descriptivo de las principales causas de aborto bovino, diagnosticadas entre los años 1991 y 2010 en el instituto de patología animal de la universidad austral de chile. Memoria de Título Médico Veterinario. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. 34 p.

MONTEJO, S. 2012. Desarrollo de vacunas frente a la neosporosis bovina utilizando aislados de *Neospora caninum* inactivados y atenuados. Tesis Doctor en Ciencias Veterinarias. Madrid, España. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria. 176 p.

MONTENEGRO, M. 2011. Identificación del Parásito *Neospora caninum* en bovinos por medio del método de ELISA, en las haciendas ganaderas del cantón Tulcán en la Provincia del Carchi. Memoria de Título Médico Veterinario y Zootecnista. Ecuador. Universidad de las Américas, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. 97 p.

MOORE, D. 2005. Neosporosis in South America. *Vet. Parasitol.* 127 (2): 87-97.

MOORE, D.; PÉREZ, A.; AGLIANO, S.; BRACE, M.; CANTÓN, G.; CANO, D.; LEUNDA, M.; ODEÓN, A.; ODRIOZOLA, E.; CAMPERO, C. 2009. Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina. *Vet. Parasitol.* 161 (1): 122-125.

OTRANTO, D.; LLAZARI, A.; TESTINI, G.; TRAVERSA, D.; DI REGALBONO, A.; BADAN, M.; CAPELLI, G. 2003. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet. Parasitol.* 118 (1): 7-18.

OULD-AMROUCHE, A.; KLEIN, F.; OSDOIT, C.; MOHAMMED, H.; TOURATIER, A.; SANAA, M.; MIALOT, J. P. 1999. Estimation of *Neospora caninum* seroprevalence in dairy cattle from Normandy, France. *Vet. Res.* 30 (5): 531-538.

- PATITUCCI, A.; PÉREZ, M.; LUDERS, C.; RATTO, M.; DUMONT, A.** 1999. Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en rebaños lecheros del Sur de Chile. Arch. Med. Vet. 31 (2): 215-218.
- PATITUCCI, A.; PEREZ, M.; ISRAEL, K.; ROZAS, M.** 2000. Prevalencia de anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en dos rebaños lecheros de la IX Región de Chile. Arch. Med. Vet. 32 (2): 209-214.
- PATITUCCI, A.; PÉREZ, M.; ROZAS, M.; ISRAEL, K.** 2001. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. Arch. Med. Vet. 33 (2): 227-232.
- PATITUCCI, A.; PÉREZ, M.; CÁRCAMO, C.; BAEZA, L.** 2004. Presencia de anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en equinos en Chile. Arch. Med. Vet. 36 (2): 203-206.
- PÉREZ, N.** 2009. Determinación de anticuerpos de *Neospora caninum* en población canina de predios bovinos lecheros de la región de Los Ríos. Memoria de Título Médico Veterinario. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. 45 p.
- PETERSEN, E.; LEBECH, M.; JENSEN, L.; LIND, P.; RASK, M.; BAGGER, P.; BJÖRKMAN, C.; UGGLA, A.** 1999. *Neospora caninum* infection and repeated abortions in humans. Emerg. Infect. Dis. 5 (2): 278-280.
- REICHEL, M.; ELLIS, J.** 2009. *Neospora caninum* – How close are we to development of an efficacious vaccine that prevents abortion in cattle? Int. J. Parasitol. 39 (11): 1173-1187.
- REICHEL, M.; MCALLISTER, M.; POMROY, W.; CAMPERO, C.; ORTEGA-MORA, L.; ELLIS, J.** 2014. Control options for *Neospora caninum* – is there anything new or are we going backwards? Parasitology. 141 (11): 1455-1470.
- ROLACK, H.** 2012. Determinación de anticuerpos de *Neospora caninum* y *Leptospira autumnalis* en una población canina de predios lecheros en la región de los ríos, Chile. Memoria de Título Médico Veterinario. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias. 41 p.

ROMERO, J.; PEREZ, E.; DOLZ, G.; FRANKENA, K. 2002. Factors associated with *Neospora caninum* serostatus in cattle of 20 specialised Costa Rican dairy herds. *Prev. Vet. Med.* 53 (4): 263-273.

SAGER, H.; FISCHER, I.; FURRER, K.; STRASSER, M.; WALDVOGEL, A.; BOERLIN, P.; AUDIGÉ, L.; GOTTSTEIN, B. 2001. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet. Parasitol.* 102 (1-2): 1-15.

SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG). 2012. Informe de situación sanitaria de Chile año 2011. División de Protección Pecuaria, Sub-departamento de Sanidad Animal. 81p.

SIERRA, R.; ESPARZA, L.; PARRA, M.; VAZQUEZ, Z.; VAZQUEZ C. 2011. Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en ganado lechero de Aguascalientes, México. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 2 (1): 15-24.

TRANAS, J.; HEINZEN, R.; WEISS, L.; MCALLISTER, M. 1999. Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. *Clin. Diagn. Lab. Immun.* 6 (5): 765-767.

VALENZUELA, P. 2005. Neosporosis en bovinos y caninos. *Mon. Electr. Patol. Vet.* 2 (1): 17-33.

VANLEEUVEN, J.; HADDAD, J.; DOHOO, I.; KEEFE, G.; TIWARI, A.; SCOTT, H. 2010. Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds. *Prev. Vet. Med.* 93 (2): 129-138.

WILLIAMS, D.; GUY, C.; SMITH, R.; MCGARRY, J.; MCKAY, J.; TREES, A. 2003. First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection. *Int. J. Parasitol.* 33 (10): 1059-1065.

ANEXO 1

Ecuaciones

1. Media del Control Negativo ($CN\bar{x}$) $CN\bar{x} = \frac{CN1 A(650) + CN2 A(650)}{2}$

2. Media del Control Positivo ($CP\bar{x}$) $CP\bar{x} = \frac{CP1 A(650) + CP2 A(650)}{2}$

3. Cálculo del cociente (M / P) $M/P = \frac{Muestra A(650) - CN\bar{x}}{CP\bar{x} - CN\bar{x}}$

ANEXO 2

1 DATOS GENERALES							
Nombre del Productor							
Teléfono de contacto							
Dirección							
Comuna							
RUP							
Geolocalización	X		Y				
2 ANTECEDENTES							
Número muestras ELISA							
Número de positivos							
3 POBLACIÓN ANIMAL							
N° Total de Bovinos							
N° vacas en Lactancia							
4 UNIDAD ANIMAL							
DIO							
Rango edad	menor a 3 años		entre 3 y 6 años		mayor o igual a 7 años		
Raza	Holstein		Jersey		Cruza HxJ		
Historial Aborto	SI		NO				
Repeticiones de celo	SI		NO				
5 FACTORES PRODUCTIVOS							
Objetivo productivo							
Responsable del manejo							
Importancia de la actividad para el productor							
Reposición de animales	SI		NO				
Origen	PROPIA		COMPRA				
6 FACTORES AMBIENTALES							
¿Tiene perros propios en el predio?		SI	NO				
Número de perros							
¿Ingresan perros ajenos al predio?		SI	NO				
¿Son perros de personas conocidas, o vagos?		Conocidos	Vagos				
¿Con qué alimenta a sus perros?		Extruido	Casera				
¿Los perros tienen acceso a?							
	Material biológico de partos/abortos	SI	NO				
	Fuente de agua de bebida de vacas	SI	NO				
	Fuente de alimento de vacas	SI	NO				
¿Existen otros animales en el predio?							
	Aves		Caballos		Gatos		Otros
¿Animales tienen acceso a sombra?		SI	NO				
Fuente de agua de bebida primaria							
	POZO		CANAL/ACEQUIA		POTABLE		
Característica de terreno							
	NORMAL		BARROSO		INUNDABLE		
7 FACTORES SANITARIOS							
Predio libre de							
	TBC	SI	Leucosis	SI	Brucelosis	SI	
		NO		NO		NO	
Desparasitaciones							
		SI					
		NO					
Manejo de placentas y restos de abortos							
	NADA		ENTIERRA				

ANEXO 3





ANEXO 4

Prevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* en ganado de Sudamérica agrupados por país, región, aptitud ganadera, número de predios estudiados, antecedentes de aborto y técnica de diagnóstico.

País	Región	Aptitud	Número de predios	Antecedentes aborto	Número animales estudiados	Porcentaje animales seropositivos	Técnica
Argentina	Pampa húmeda	Leche	3	Si	33	51,5	IFAT
		Carne	18	Si	46	21,7	
		Leche	1	Si	9	88,8	IFAT
		Leche	19	Si	189	64,5	IFAT, NAT, ELISA
		Leche	49	Si	750	43,1	IFAT
			52	No	1048	16,6	
		Carne	39	Si	216	18,9	
	Corrientes		17	No	400	4,7	
		Carne	1	Si	290	20,3	IFAT
		Carne	19	-	305	4,9	IFAT
Brasil	NA	Leche	1	Si	10	60	IFAT
	Bahía	Leche	15	No	447	14,1	IFAT
	Paraná	Leche	1	Si	172	34,8	ELISA e IFAT
	Paraná	Leche	23	NA	623	14,3	IFAT
	Río Grande do Sul	Leche	5	Si	223	11,2	IFAT
	Mínas Gerais	Leche	18	No	576	18,4	ELISA
Chile	Región de La Araucanía	Leche	3	Si	55	36,4	IFAT
		Leche	2	Si	371	22,4	IFAT
Paraguay	Central, Concepción y Cordillera Paraguari Alto Paraguay, Boquerón, Presidente Hayes y Paraguari.	Leche	33	No	297	36	ELISA
		Carne	5	No	582	26,6	
Perú	Valle de Lima	Leche	9	Si	29	62,1	IFAT
Uruguay	NA	Leche	1	Si	217	56,7	IFAT