

C. Nogareda, R. Colomé, M. Navarro, R. Armengol y A. Jubert

**ESTUDIO DE LA NEOSPOROSIS EN MUESTRAS DE LECHE DE TANQUE
E INDIVIDUALES Y SU RELACIÓN CON FACTORES DE MANEJO
DE LA EXPLOTACIÓN Y DE CALIDAD DE LA LECHE**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **107** N.º 4 (272-280), 2011

Estudio de la neosporosis en muestras de leche de tanque e individuales y su relación con factores de manejo de la explotación y de calidad de la leche

C. Nogareda*¹, R. Colomé*, M. Navarro*, R. Armengol* y A. Jubert**

¹ Autor para correspondencia: Tel. +34 973 00 36 62; Fax +34 973 70 28 74

E-mail: cnogareda@prodan.udl.cat

* Departamento de Producción Animal, Centro de Investigación en Producción Animal (CIPA) de la Universitat de Lleida (UdL) 25198 Lleida; Spain

** ALLIC (Asociación Interprofesional Lechera de Cataluña) Ctra. Vilassar a Cabrils, s/n 08348 Cabrils (Barcelona), Spain

Resumen

La neosporosis, causada por el parásito *Neospora caninum* es una de las causas más importantes de abortos de ganado bovino a nivel mundial. En este trabajo se ha estudiado la presencia de anticuerpos frente *N. caninum* en muestras de leche de tanque e individuales con un test ELISA indirecto comercial. Se visitaron y encuestaron 16 explotaciones catalanas de las que el 69% fueron positivas. Del análisis estadístico de la encuesta se obtuvo una relación significativa entre la positividad del tanque y la presencia de perros en la explotación. Finalmente, se analizó individualmente la leche de cuatro granjas y los resultados se relacionaron con los parámetros de calidad de la leche correspondiente a cada vaca. Los resultados demostraron de forma significativa que mayores niveles de anticuerpos en leche se relacionaban con porcentajes más altos de proteína pero más bajos de lactosa.

Palabras clave: neosporosis, anticuerpos, ELISA, leche, vacuno, prevalencia.

Summary

Study of neosporosis in bulk tank and individual milk samples and their relationship with farm management and milk quality

Neosporosis is a disease caused by the parasite *Neospora caninum* considered one of the most important cause of abortion on cows worldwide. We have studied the presence of antibodies against *N. caninum* analyzing the bulk tank and the individual milk using a commercial indirect ELISA test. Sixteen farms were visited and surveyed and from them 69% were positives. Statistical analysis showed that the antibodies were higher in the bulk tank in the herds in which dogs were present on the farm. Finally, the individually cow's milk was analyzed in four farms and the results were related with their individual milk quality parameters and it was observed that level of positivity to *N. caninum* in individual milk was related to increased protein but to decreased lactose in milk.

Key words: neosporosis, antibodies, ELISA, milk, bovine, prevalence.

Introducción

La neosporosis es una enfermedad causada por *Neospora caninum*, un protozoo intracelular obligado, estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii* que se describió por primera vez en perros en 1984 (Bjerkas *et al.*, 1984). El ciclo de *N. caninum* es indirecto y existen tres estadios infectantes. Los dos primeros están en el interior de los huéspedes intermedios (HI), principalmente en las vacas y el tercer estadio son los ooquistes que excretan los perros u otros carnívoros que son los huéspedes definitivos (HD) (McAllister *et al.*, 1998).

Los HD ingieren los quistes al consumir parte de placentas o fetos abortados de vacas infectadas y en su interior se desarrolla la fase sexual del parásito con la formación de ooquistes que se excretan y esporulan en el medio ambiente convirtiéndose en infectantes para los HI (Almería y López-Gatius, 2009). Existe también la forma vertical o endógena de mantener la infección en un rebaño que se produce cuando la madre positiva infecta al feto durante la gestación mediante transmisión transplacentaria (Trees y Williams, 2005) por lo que las hembras positivas contribuyen al mantenimiento de la infección (Hietala y Thurmond, 1999).

La neosporosis está asociada al riesgo de aborto en vacas lecheras, la mayoría entre los 5-7 meses de gestación. (López-Gatius *et al.*, 2005). Durante la gestación, los fetos pueden morir en el útero, ser reabsorbidos o momificados, pero si la gestación llega a término, los terneros pueden nacer muertos o vivos con síntomas clínicos o bien nacer clínicamente normales pero crónicamente infectados (Dubey, 2003).

El diagnóstico en animales vivos se basa en la detección de anticuerpos específicos anti-*Neospora* en el suero sanguíneo o en la leche. Se han desarrollado numerosas pruebas ELISA comerciales para la detección de

anticuerpos específicos con sensibilidad y especificidad elevada (Blumröder *et al.*, 2004; Bartels *et al.*, 2006). Algunos han sido adaptados para poder analizar muestras de leche (Schaes *et al.*, 2004; Bartels *et al.*, 2005). Recientemente en Galicia se ha llevado a cabo un estudio de la enfermedad en leche y en suero sanguíneo demostrando resultados muy coincidentes en ambos tipos de muestras (Gonzalez-Warleta *et al.* 2011).

Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la presencia de anticuerpos frente *N. caninum* en muestras de leche de tanque en 16 explotaciones de ganado vacuno de Cataluña, estudiar los posibles efectos y factores de riesgo de la enfermedad mediante una encuesta al ganadero y conocer si existe relación entre los niveles de anticuerpos anti-*Neospora* en la leche individual y sus parámetros de calidad.

Materiales y métodos

Obtención de las muestras

Las muestras de leche se consiguieron a través de la Asociación Interprofesional lechera de Cataluña (ALLIC), Cabriels (Barcelona). Esta asociación recibe diariamente muestras de cada tanque de leche recogido en las granjas y controlan sus parámetros de calidad físico-químicos y microbiológicos. Mensualmente reciben las muestras individuales de todas las vacas en lactación para hacer el control lechero. Para el estudio, las muestras de leche cruda se recogieron en el laboratorio de la ALLIC y se trasladaron al laboratorio del CIPA de la Universidad de Lleida. Tanto las muestras de leche de tanque como las individuales se obtuvieron en frascos de plástico con un volumen aproximado de 25 ml a 4°C conservadas con azidiol (conservante bacteriostático) en el caso de leche de

tanque o bronopol (conservante bactericida) en el caso de leche individual. ALLIC facilitó los correspondientes resultados del análisis de los parámetros de calidad: grasa, proteína, lactosa, extracto seco magro (ESM), células somáticas y urea.

Tipo de muestras y toma de datos

Se analizaron 16 muestras de tanque que correspondieron a explotaciones que se visitaron y encuestaron (8 de la provincia de Barcelona, 4 de Lleida y 4 de Girona). No se analizaron muestras de la provincia de Tarragona debido al escaso número de granjas de vacuno lechero en esta provincia. La encuesta constaba de 46 preguntas que se hicieron directamente al ganadero. Las preguntas estaban relacionadas con datos de la explotación, los nacimientos, los abortos, el manejo de los fetos abortados, la presencia de perros en la explotación y su contacto (o el de sus heces) con las vacas o con el pienso, forraje etc., de manera que se pudieran evidenciar posibles síntomas, problemas reproductivos o cuadros clínicos de neosporosis.

En un segundo apartado se analizaron individualmente 261 muestras de leche de cuatro granjas positivas (de 60, 96, 52 y 53 vacas en lactación en el momento del análisis) en el estudio anterior y de cada muestra se obtuvieron datos de los parámetros de calidad proporcionados por ALLIC.

Análisis de anticuerpos anti-*Neospora* de las muestras

Para la detección de los anticuerpos anti-*Neospora* en la leche, tanto de tanque como individual, se utilizó un kit comercial de ELISA indirecto: (CIVTEST® anti-*Neospora*; Hipra, Girona). Esta técnica utiliza como antígeno un lisado del taquizoito completo denominado NC-1 (Dubey, 1988) que se encuentra adherido a las microplacas del kit. Se siguie-

ron las instrucciones del fabricante utilizando los reactivos y los controles positivos y negativos suministrados en el kit.

Las muestras de leche cruda se desnataron centrifugándose a 4° C a 1000 g durante 15 minutos. Para el análisis se dispensaron 100 µl de leche desnatada por muestra directamente en los pocillos de la placa del kit. Después de añadir los controles se mantuvo la placa durante 16-18 horas en la nevera a 4° C. Después del lavado se añadieron 50 µl de la solución de conjugado y la placa se incubó en estufa a 37° C durante 60 minutos. Después de otro lavado se dispensaron 50 µl de la solución cromógena y se mantuvo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, se frenó la reacción con 50 µl de la solución de parada y se cuantificó el color de los pocillos de la placa utilizando un lector ELISA equipado con un filtro de 405 nm. El color de cada pocillo expresado en densidades ópticas (DO) será proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos anti-*Neospora*.

Para la interpretación de los resultados se calculó el índice relativo x 100 (IRPC) de cada muestra:

$$\text{IRPC} = \left[\frac{(\text{DO}_{405} \text{ muestra} - \text{Media DO}_{405} \text{ Control negativo})}{(\text{Media DO}_{405} \text{ Control positivo} - \text{Media DO}_{405} \text{ Control negativo})} \right] * 100.$$

Interpretación de los resultados

En el protocolo del kit, para la leche de tanque, cuando el valor de IRPC es menor o igual a 3,0 se considera que la prevalencia de anticuerpos anti-*Neospora* en los animales que aportan leche al tanque es inferior al 5-10% y cuando el IRPC es mayor que 3,0 la prevalencia estará por encima del 10%. En nuestro estudio y para poder analizar estadísticamente los resultados, las explotaciones con valores menores o iguales a 3,0 se consideraron negativas y las superiores a 3,0 positivas.

Siguiendo el protocolo del kit, para la leche individual, cuando el valor de IRPC es menor o igual a 4,74 la muestra es considerada negativa a *N.caninum*, y cuando es superior a 4,74 positiva.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de asociación entre la variable discreta IRPC (positiva; negativa) y los factores de riesgo obtenidos a partir de las respuestas de la encuesta. Las preguntas y los niveles de respuesta fueron las siguientes: tamaño explotación (grande; mediana; pequeña) terneros nacidos con menor peso (alguna vez; nunca), mortalidad de terneros al nacimiento (frecuente; alguna vez; nunca), estación del año con más abortos (verano; sin predominio), trimestre de gestación con más abortos (primero; segundo y tercero), presencia de restos de abortos y placentas (sí; no) presencia de perros (sí; no) y observación de heces de perro en la granja (normalmente; alguna vez; nunca). Este análisis se ha realizado mediante el procedimiento FREQ del SAS versión 9.2 (Statistical Analysis Software, Cary, NC). El efecto de los diferentes factores de riesgo sobre la variable continua nivel de IRPC ha sido analizado mediante un análisis de varianza para cada factor mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS. En el caso de las muestras de leche individuales los parámetros de calidad de la leche también se relacionaron con el IRPC, tanto por regresión lineal (IRPC como variable explicativa), como por análisis de varianza para analizar si existía alguna diferencia entre los animales positivos y los negativos.

Resultados

De las 16 explotaciones analizadas en este estudio, 11 (68,8%) fueron positivas y 5 (31,2%) negativas. En la provincia de Barcelona fueron positivas 6 de las 8 granjas analizadas y 3 en Girona y 2 en Lleida de las 4 granjas analizadas en cada una de estas provincias.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los principales factores relacionados con la media del IRPC para cada respuesta y su significación. Al relacionar los diferentes factores considerados como variables discretas en la encuesta con la variable continua IRPC, se observó que había un efecto significativo ($P < 0,05$) entre el riesgo de la presencia de perros y la presencia de anticuerpos en leche de tanque en las explotaciones analizadas. En 10 de las 11 explotaciones positivas y en 3 de las 5 negativas había presencia de perros. Ningún otro factor de la encuesta resultó significativo.

Los resultados del análisis de regresión GLM entre el IRPC de la leche de 261 vacas y los parámetros de calidad individual como variables continuas se muestran en la Tabla 2. Los parámetros afectados significativamente por el IRPC fueron la proteína y la lactosa, de forma que las vacas con más anticuerpos produjeron leche con mayor porcentaje de proteína y menor porcentaje de lactosa ($P < 0,01$). En la Tabla 3, se puede observar la relación entre los diferentes parámetros de calidad de la leche según la positividad a *Neospora* de la vaca (83 vacas positivas y 178 negativas). Los datos de los parámetros de calidad de la leche de los animales analizados son algo superiores a la media de los datos del mismo mes del estudio durante 7 años (febrero) (3,82% de grasa, 3,18% de proteína, 4,66% de lactosa y 8,57% de ESM) (www.allic.org).

Tabla 1. Resultados de la regresión (GLM) de las 16 explotaciones encuestadas entre los diferentes niveles de respuesta obtenidos en la encuesta y la media del IRPC (niveles de anticuerpos anti-Neospora mediante ELISA indirecto)

Table 1. Regression results (GLM) of the 16 farms relating different levels of response obtained in the survey and the IRPC (antibody anti-Neospora levels by indirect ELISA)

| Factores de riesgo | Niveles | Media IRPC | Desviación estándar |
|--|------------------------|------------|---------------------|
| Tamaño explotación | Grande (> 150 vacas) | 8,26 | 2,82 |
| | Mediana (50-150 vacas) | 7,02 | 2,82 |
| | Pequeña (< 50 vacas) | 6,96 | 2,30 |
| Terneros nacidos con menor peso del esperado | Alguna vez | 6,88 | 2,41 |
| | Nunca | 8,19 | 1,80 |
| Mortalidad de terneros al poco de nacer (15 días) | Frecuente | 10,69 | 2,56 |
| | Alguna vez | 6,52 | 2,09 |
| | Nunca | 5,25 | 2,56 |
| Estación del año con mayor porcentaje de abortos | Verano | 9,36 | 3,07 |
| | No hay predominio | 6,8 | 1,60 |
| Trimestre de gestación con mayor porcentaje de abortos | Primero | 7,70 | 2,21 |
| | Segundo y tercero | 7,08 | 1,92 |
| Presencia de restos de aborto y placentas | Si | 8,76 | 3,10 |
| | No | 6,96 | 1,62 |
| Presencia de perros | Si | 8,81* | 1,36 |
| | No | 1,98 | 2,61 |
| Observación de heces de perro alrededor de la granja | Normalmente | 9,74 | 2,43 |
| | Alguna vez | 9,45 | 2,43 |
| | Nunca | 4,35 | 1,99 |

* P<0,05.

Tabla 2. Resultados de la regresión (GLM) de los 261 análisis de las muestras de leche expresados en IRPC (niveles de anticuerpos anti-Neospora mediante ELISA indirecto) y los parámetros de calidad con los valores de la pendiente de la recta (b) y la significación

Table 2. Results of regression (GLM) of the 261 individual tests in IRPC (antibody anti-Neospora levels by indirect ELISA) and the quality parameters with the values of the line slope (b) and significance

| Factor | Grasa | Proteína | Lactosa | ESM | log (cel) | Urea |
|----------|-------|----------|----------|-------|-----------|--------|
| b | 0,003 | 0,007** | -0,003** | 0,003 | 0,003 | -0,660 |

** P < 0,01.

Tabla 3. Resultados de la regresión (GLM) entre los parámetros de calidad de la leche de 261 vacas diferenciando animales positivos y negativos a anticuerpos anti-*Neospora* mediante ELISA indirecto
 Table 3. Regression results (GLM) of the milk quality parameters of 261 cows differentiating negative and positive animals to antibody anti-*Neospora* by indirect ELISA

| | Media animales positivos | Desviación estándar | Media de los animales negativos | Desviación estándar |
|----------------|--------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|
| Grasa (1) | 3,896 | 0,083 | 3,829 | 0,051 |
| Proteína (1)** | 3,495 | 0,051 | 3,331 | 0,032 |
| Lactosa (1)** | 4,761 | 0,033 | 4,867 | 0,020 |
| ESM (1) | 8,999 | 0,054 | 8,966 | 0,033 |
| log (cel) (2) | 2,055 | 0,067 | 1,983 | 0,041 |
| Urea (3) | 207,00 | 8,941 | 216,55 | 5,705 |

** P<0,01.

(1) % Peso/Peso; (2) células somáticas (x1000/ml); (3) mg/l.

(1) % Weight/Weight; (2) somatic cells (x1000/ml); (3) mg/l.

Discusión

El presente estudio es el primero que se ha realizado analizando la neosporosis en muestras de leche de tanque e individual en Cataluña. Otros autores utilizando otro kit comercial (Herd Check Anti-*Neospora* ELISA, IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) para determinar la presencia de anticuerpos en leche han comprobado que es una muestra válida para el análisis de la prevalencia de anticuerpos de esta enfermedad (Schaes *et al.*, 2004, Wapenaar *et al.*, 2007).

A diferencia del calostro, el contenido de inmunoglobulinas en la leche es casi 30 veces menor que en el suero de la sangre (Korhonen *et al.*, 2000), pero aún así es una muestra a tener en cuenta para el diagnóstico de la neosporosis. Las ventajas del uso de la leche es su fácil obtención a través de las empresas que realizan el control lechero, una vez ellos han finalizado sus análisis (suelen obtener muestras de tanque cada día y muestras individuales por vaca una vez al mes) ya que no se molesta ni a las vacas ni a los ganaderos. La

desventaja es que sólo obtenemos muestra de las vacas que están en lactación en el momento de la recogida de muestras. Resultados previos a este estudio demostraron que la enfermedad se encuentra en casi el 90% de las explotaciones catalanas (Nogareda *et al.*, sometido), sin detectarse diferencias importantes entre zonas geográficas. Para ello se analizaron 90 explotaciones de las 814 censadas en el momento del estudio. Estos resultados nos animaron a estudiar y encuestar de manera más profunda a dieciséis granjas de las zonas lecheras de Cataluña. Somos conscientes que las 16 granjas encuestadas son una muestra reducida de la población total y eso ha dificultado poder encontrar diferencias significativas que relacionen las respuestas de los ganaderos con los resultados de los análisis en el tanque de leche. Sin embargo, se observó una relación significativa entre los niveles de anticuerpos anti-*Neospora* y la presencia de perros en las explotaciones ya fueran propios o forasteros ocasionales. Estos resultados son destacables ya que confirman que los perros juegan un papel

importante en la transmisión de la enfermedad. Wouda *et al.* (1999) observaron que en explotaciones donde los perros no estaban presentes la seroprevalencia fue significativamente menor que en granjas donde sí lo estaban. También Vázquez-Moreno (2007), observó una asociación positiva entre la seropositividad del perro y la de las vacas al estudiar la presencia de *N. caninum* en poblaciones de perros de granja.

Como las vacas se pueden infectar al ingerir ooquistes esporulados que provienen de las heces de los perros se preguntó al granjero si había observado heces de perro alrededor de la explotación, pero no se obtuvieron resultados significativos entre la positividad del tanque y sus respuestas (Tabla 1). Sin embargo debe destacarse que la media de los niveles de anticuerpos de los tanques fue menor (4,35) cuando la respuesta fue que nunca observaron heces de perro alrededor de la granja, comparada con los niveles medios obtenidos cuando las heces se observaban normalmente (9,74) o alguna vez (9,45). Esta amplia diferencia demuestra la importancia de las heces de los perros en la transmisión de la enfermedad en las granjas. También se preguntó en la encuesta sobre diferentes repercusiones clínicas descritas de la enfermedad, como la existencia de abortos, el trimestre de gestación, el porcentaje de terneros nacidos muertos, o bien de terneros con lesiones musculares o con menos peso del normal sin obtenerse relaciones significativas. Tal como se ha mencionado anteriormente, se necesitaría un número mayor de granjas y más estudios para poder relacionar correctamente estas respuestas con el muestreo de los tanques.

Como el ciclo biológico de la enfermedad se mantiene al infectarse los perros al consumir carne o fetos abortados infectados, se preguntó si los restos de los abortos se controlaban (es decir si el manejo de la granja facilita que los residuos biológicos puedan ser consumidos por los perros). No se evidenció ninguna relación entre este control y los resultados de

los análisis. Hay que tener en cuenta que el ganadero no siempre puede controlar la presencia de perros o sus heces o retirar los fetos u otros restos de abortos ya que durante la noche son difícilmente controlables. Respecto al tamaño de la explotación, no se observó ningún efecto significativo pero se apreció que las explotaciones grandes (correspondientes a explotaciones de más de 150 vacas) eran más positivas que las pequeñas.

Al disponerse de los resultados de los parámetros de calidad de la leche individual que facilitó ALLIC, se pudieron comparar estos resultados con el nivel de anticuerpos de cada vaca. No se observaron diferencias entre vacas positivas y negativas en cuanto a grasa, extracto seco magro, células somáticas o cantidad de urea de la leche. Pero sí se obtuvieron diferencias significativas de manera que las vacas con más anticuerpos anti-*Neospora* producían leche con mayor porcentaje de proteína, pero a su vez con menor porcentaje de lactosa. Al estudiar esta relación la recta (b) da valores muy bajos debidos seguramente a la intervención de otros factores que influyen en los porcentajes de proteína y lactosa. Sin embargo, estas diferencias significativas se confirmaron al comparar la media de la proteína y la lactosa de los animales positivos y de los negativos donde se observa claramente que la media de la proteína de los animales positivos es significativamente superior que la de los negativos y por el contrario, la media de la lactosa es significativamente inferior en las vacas positivas que las negativas. Según Pfeiffer *et al.* (2002) la proteína en la leche podría verse afectada en animales positivos a neosporosis, pero en su trabajo no queda claro de qué manera afecta. No se ha encontrado ningún otro estudio donde se observe que la proteína y la lactosa se vean afectadas por la infección como tampoco se ha hallado para ningún otro parámetro de calidad de leche. De hecho Hall, *et al.* (2005) no encontraron diferencias significativas ni en la proteína ni en la

producción de grasa entre las vacas seropositivas y las seronegativas a *Neospora* confirmado en otro estudio posterior (Hall, *et al.*, 2006) en el que volvieron a demostrar que no había ningún efecto para la proteína y para la grasa ni en las células somáticas. Por tanto, el efecto de la proteína y la lactosa provocado por el aumento de anticuerpos no es fácil de justificar y deberían hacerse más estudios para demostrar esta relación. Por otra parte, no se cree que el aumento de inmunoglobulinas en la leche debido a los anticuerpos anti-*Neospora* sea suficiente como para aumentar significativamente este parámetro, ya que éstas representan un porcentaje muy bajo de las proteínas totales de la leche (Korhonen *et al.*, 2000).

A la vista de estos resultados se puede deducir que los análisis de anticuerpos anti-*Neospora* de las muestras de leche de tanque son orientativos, pero pueden ser una buena opción para llevar un control de la enfermedad en las granjas. Debido a que la obtención de una vacuna eficaz que prevenga la neosporosis está aún en fase de estudio (Aguado-Martínez *et al.*, 2009, Monney *et al.*, 2011), el análisis individual de la leche, al igual que el análisis del suero sanguíneo, sería muy útil para controlar la transmisión vertical en la granja, ya que es aconsejable deshacerse de las vacas positivas (Hall *et al.*, 2006).

Además de la restricción de la entrada de perros en las granjas bovinas, otra estrategia para reducir el riesgo de aborto en vacas positivas es su inseminación con semen de vacuno de carne, con lo que disminuye la prevalencia de la neosporosis al descartar a las hijas como reposición. Por otro lado, se ha demostrado que la inseminación con semen de vacas cárnicas, sobre todo de la raza Limusina reduce el porcentaje de abortos en las vacas positivas (López-Gatius *et al.*, 2005, Almería *et al.*, 2009).

Las principales conclusiones de este estudio serían las siguientes: Mediante el análisis de leche de tanque se observó una alta prevalencia de anticuerpos frente *N. caninum* en

las explotaciones analizadas, aunque las titulaciones predominantes fueron bajas. Mediante encuestas a los ganaderos, se obtuvo una relación significativa entre la presencia de perros en la explotación y la positividad de los tanques de leche. Las vacas con anticuerpos anti-*Neospora* produjeron leche con un porcentaje significativamente más alto de proteína pero más bajo de lactosa que los animales sin anticuerpos.

Agradecimientos

A Daniel Villalba por su colaboración en los análisis estadísticos de los datos, a HIPRA por la cesión de los kits de diagnóstico, al personal de ALLIC (Associació Interprofesional Lletera de Catalunya) y al Observatori de la Llet por su ayuda. Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto CICYT AGL2010-21273-C03-01/GAN.

Bibliografía

- Aguado-Martínez A, Álvarez-García G, Fernández-García A, Risco-Castillo V, Marugan-Hernández V, Ortega-Mora LM, 2009. Reduced vaccine efficacy against neosporosis in mice generated by *Neospora caninum* immunogenic recombinant proteins rNcSAG4 and rNcGRA7. *Vaccine* 27: 7331-7338.
- Almería S y López-Gatius F. 2009. Aspectos epidemiológicos de la neosporosis bovina en el Nordeste español. Una perspectiva clínica. *ITEA* 105:296-312.
- Almería S, López-Gatius F, García-Ispuerto I, Nogareda C, Bech-Sàbat G, Serrano B, Santolaria P, Yániz JL. 2009. Effects of crossbreed pregnancies on the abortion risk of *Neospora caninum*-infected dairy cows. *Vet Parasitol.* 163:323-329.
- Bartels CJM, van Maanen C, van der Meulen AM, Dijkstra T., Wouda W, 2005. Evaluation of three enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to *Neospora caninum* in bulk milk. *Vet Parasitol* 131: 235-246.

- Bartels CJM, Arnaiz-Seco J, Ruiz-Santa-Quiteria A., Björkman C., Frössling J., von Blumröder D, 2006. Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden. *Vet. Parasitol* 137:17-27.
- Bjerkås I, Mohn S F, Presthus J, 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70, 271-274.
- Björkman C, Holmdahl OJ, Ugglå A. 1997. An indirect enzyme-linked immunoassay (ELISA) for demonstration of antibodies to *Neospora caninum* in serum and milk of cattle. *Vet Parasito.* Feb; 68:251-60.
- Blumröder von D, Schares G, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Wright S, Björkman C, Frössling J, Risco-Castillo V, Fernández-García A, Ortega-Mora LM, Sager H, Hemphill A, van Maanen C, Wouda W, Conraths FJ. 2004. Comparación and standardisation of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. *Vet Parasitol.* 120: 11-22.
- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay D S, Topper MJ, 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Amer Vet Med Associ.* 193:1259-1263.
- Dubey JP, 2003. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean Journal of Parasitology* 41: 1-16.
- Gonzalez-Warleta M, Castro-Hermida JA, Carro-Moral C Mezo M, 2011. Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. *Prev Vet Med* 101: 58-64
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT, 2005. *Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control. *Vet Parasitol*128:231-241.
- Hall CA, Reichel MP, Ellis JT, 2006. Prevalence of *Neospora caninum* infection in Australian (NSW) dairy cattle estimated by a newly validated ELISA for milk. *Vet Parasitol.* 142:173-178.
- Hietala, SK y Thurmond MC, 1999. Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. *Int. J. Parasitol.* 29:1669-1676.
- Korhonen H, Marnila P, Gill HS, 2000. Milk immunoglobulins and complement factors. *British J Nutrition*, 84, Suppl. 1 S75-S80.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yániz JL, Garbayo JM, Almería S, 2005. The Use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. *J. Vet. Med. B* 52, 88-92.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WS, Wills RA, McGuire AM, 1998. Rapid communication: Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J Parasitol.* 28:1473-1479.
- Monney T, Debache K, Heemphill A, 2011. Vaccines against a Major Cause of Abortion in Cattle, *Neospora caninum* Infection. *Animals* 1:306-325.
- Pfeiffer DU, Williamson NB, Reichel MP, Wichtela JJ, Teaguec WR, 2002. A longitudinal study of *Neospora caninum* infection on a dairy farm in New Zealand. *Prev Vet Med.* May 30:11-24.
- Schares G, Bärwald A, Staubach C, Wurm R Rauser M, Conraths FJ, Schroeder C, 2004. Adaptation of a commercial ELISA for the detection of antibodies against *Neospora caninum* in bovine milk. *Vet Parasitol*120: 55-63.
- Trees AJ, Williams DJL, 2005. Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Trends Parasitol.* 21: 558-561.
- Vázquez-Moreno E, 2007. Presencia de *Neospora caninum* y otros parásitos gastrointestinales en perros procedentes de poblaciones de riesgo en España. *RCCV Vol. 1* (2).
- Wapenaar W, Barkema, HW, O'Handley RM, Bartels CJM 2007. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay in bulk milk to estimate the prevalence of *Neospora caninum* on dairy farms in Prince Edward Island, Canada. *Can Vet J* 2007; 48:493-499.
- Wouda W, Dijkstra T, Kramer AM, van Maanen C, Brinkhof JM. 1999. Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. *International Journal for Parasitology*, 29:1677,1682.

(Aceptado para publicación el 3 de noviembre de 2011)