

Factores de Riesgo Asociados a la Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos Naturalmente Infectados en la Ceja de Selva de Oxapampa, Perú

RISK FACTORS ASSOCIATED WITH THE SEROPREVALENCE OF *Neospora caninum* IN NATURALLY INFECTED BOVINE IN THE TROPICAL HIGHLANDS OF OXAPAMPA, PERU

Carlos Portocarrero M.¹, Rosa Pinedo V.^{1,4}, Néstor Falcón P.², Amanda Chávez V.^{1,3}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar los factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos naturalmente infectados en la ceja de selva de Oxapampa, Perú. El trabajo se desarrolló en 20 hatos ganaderos de los distritos de Chontabamba y Oxapampa. Se obtuvieron muestras de sangre de 388 bovinos mayores de 6 meses, y mediante una encuesta se levantó información situacional y epidemiológica de las ganaderías para identificar los potenciales factores de riesgo. La presencia de anticuerpos contra *N. caninum* se determinó mediante la técnica de ELISA de competencia (cELISA), utilizando un kit comercial. La asociación entre la seroprevalencia a *N. caninum* y las variables evaluadas (grupo etario, procedencia, tamaño del hato, eliminación de restos de animales muertos y número de perros por hato) se analizaron mediante regresión logística. Se encontró una seroprevalencia de $18.8 \pm 3.9\%$. Los factores de riesgo asociados con la seropositividad de *N. caninum* fueron la presencia de más de tres perros en el hato, la eliminación de restos de animales muertos al aire libre y un tamaño de hato mayor de 100 animales ($p < 0.05$), en tanto que la edad y procedencia no influyeron en el riesgo de presentación de *N. caninum*.

Palabras clave: anticuerpos, abortos, ELISA de competencia, odds ratio, prevalencia corregida

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the risk factors associated with the seroprevalence of *Neospora caninum* in naturally infected bovine in the tropical highlands of Oxapampa, Peru. The study was carried out in 20 herds in Chontabamba and Oxapampa

¹ Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ E-mail: achavezvg@gmail.com

⁴ E-mail: rosita_vet99@gmail.com

Recibido: 1 de diciembre de 2013

Aceptado para publicación: 20 de agosto de 2014

districts. Blood samples were collected from 388 animals older than 6 months of age, and a survey was conducted to identify potential risk factors in the herds. The presence of antibodies against *N. caninum* was done by the c-ELISA test using a commercial kit. The association between seroprevalence of *N. caninum* and the variables evaluated (age group, origin, herd size, disposal of animal remains, number of dogs per herd) were analyzed by the logistic regression. The seroprevalence of *N. caninum* was $18.8 \pm 3.9\%$. The risk factors associated with seroprevalence of *N. caninum* in bovine were the presence of more than three dogs in the herd, the disposal of animal remains in the environment and a herd size larger than 10 animals ($p < 0.05$), whereas age and origin did not influence the presence of *N. caninum*.

Key words: antibodies, abortions, competitive ELISA, odds ratio, corrected prevalence

INTRODUCCIÓN

La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo denominado *Neospora caninum*. Afecta principalmente al ganado bovino, adquiriendo gran importancia a nivel mundial por los altos índices de prevalencia y estar implicado como uno de los principales agentes causales de aborto (Thilsted y Dubey, 1989; Andresen, 1999). *N. caninum* presenta un ciclo de vida indirecto que incluye al perro (*Canis familiaris*) y coyote (*Canis latrans*) como hospederos definitivos (McAllister *et al.*, 1998; Gondim *et al.*, 2004). Así mismo, se describen diversos hospederos intermediarios, tanto animales domésticos (caninos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y equinos) como silvestres (lobos, coyotes, zorros, ciervos y alces) (Moore *et al.*, 2002; Fuchs *et al.*, 2005).

El parásito puede ser transmitido de forma horizontal a los bovinos, sea por la ingestión de alimento o a través de agua contaminada con ooquistes del protozoo expulsados con las heces en perros agudamente infectados, o de forma vertical desde la madre infectada a su cría durante la gestación (Dubey *et al.*, 2006, 2007). Esto último es una característica importante de la enfermedad, ya que

el parásito puede permanecer latente como una infección crónica. Si la infección del feto no resulta en aborto, la cría resultante puede convertirse en portador clínicamente sano (asintomático), pudiendo transmitir la infección a la siguiente generación (Anderson *et al.*, 2000).

En el Perú, estudios realizados en ganado bovino registran la presencia de *N. caninum* con prevalencias de 30 a 57% en las cuentas lecheras de Lima y Arequipa (Andersen, 1999; Silva *et al.*, 2002). La manifestación de la infección por *N. caninum* presenta un carácter multifactorial donde pueden estar involucrados factores intrínsecos atribuibles al animal, así como factores extrínsecos atribuibles al rebaño o de la finca ganadera asociados a determinadas prácticas de manejo. En la actualidad, la información acerca de los factores de riesgo es escasa y, además, no existe un tratamiento específico contra la neosporosis. Por lo tanto, las medidas orientadas a la prevención y control fundamentadas en el conocimiento de la epidemiología de la neosporosis bovina son de gran relevancia. El objetivo del estudio fue determinar los factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de *N. caninum* en bovinos naturalmente infectados en la ceja de selva de Oxapampa, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y Animales del Estudio

El estudio se llevó a cabo en 20 hatos bovinos de doble propósito en los distritos de Oxapampa y Chontabamba, departamento de Pasco, Perú, entre mayo y setiembre de 2012. Esta zona de carácter tropical se encuentra ubicada en el flanco amazónico de los Andes centrales y en la porción oriental de la región Pasco. Presenta un clima húmedo semicálido, con temperatura promedio de 13 a 20 °C (Municipalidad Distrital de Oxapampa, 2009).

Los animales eran, en su mayoría, cruces de razas *Bos taurus* con razas *Bos indicus* y con predominio de los cruces Gyr x Holstein (Girolando) y Gyr x Brown Swiss, además de los cruces entre las razas Simmental, Brahman y Jersey con ganado criollo adaptado a la zona. Se trabajó con animales mayores de seis meses de edad, criados en forma semiextensiva, cuya alimentación estuvo basada principalmente en pastos naturales (*Paspalum conjugatum*, *Brachiaria decumbens* y *B. brizantha*).

Tamaño Muestral y Muestras

El tamaño mínimo muestral se determinó mediante la fórmula de proporción de poblaciones finitas con 95% de confianza y 5% de precisión (Daniel, 1996), utilizando 13.2% como prevalencia referencial (Puray *et al.*, 2006). El número mínimo necesario para el estudio fue de 162 muestras; sin embargo, se llegaron a recolectar 388 muestras procedentes de 20 ganaderías. Para esto, se muestreó el 20% de cada hato; es decir, entre 10 y 26 animales por hato.

Se obtuvieron muestras de sangre en tubos Vacutainer®, por punción directa de las venas yugular o coccígea media. Se registró la fecha de muestreo, sexo, edad (mediante dentición y registros), propietario y distrito de procedencia. El material colectado

fue almacenado en refrigeración durante dos días y posteriormente trasladado en recipientes térmicos con refrigerante al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, para la extracción de suero, mediante centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos.

Determinación de Anticuerpos contra *N. caninum*

Se utilizó un «kit» comercial de ELISA de Competencia (*Neospora caninum* Antibody Test Kit, cELISA de VMRD, EEUU) y se siguió el protocolo del fabricante. Se consideraron como muestras positivas aquellas con densidades ópticas que mostraron un nivel de inhibición igual o mayor que 30% y como muestras negativas a un nivel de inhibición menor de 30%.

Análisis de la Información

Se levantó información situacional y epidemiológica de cada rebaño mediante una encuesta. Se colectó información sobre tipo de explotación, tamaño del hato, número de canes por fundo, antecedentes de abortos, disposición de restos de animales muertos y otros aspectos de manejo.

En el análisis se consideraron tres grupos etarios (1 a <3, 3 a 5, >5), dos zonas de procedencia (Oxapampa y Chontabamba), tres tamaños de hato (1 a 50, 51 a 100, >100), dos formas de eliminación de los restos de animales muertos (enterrados, al aire libre) y tres números de perros por hato (0, 1 a 3, >3).

Se determinó la prevalencia de *N. caninum* mediante la fórmula de Thrusfield (1990), así como los intervalos de confianza. Se calculó la prevalencia corregida según la sensibilidad (97.6%) y especificidad (98.6%) de la prueba (Baszler *et al.*, 2001). Asimismo, se analizó la asociación entre la seroprevalencia a *N. caninum* y los potenciales factores de riesgo mediante regresión

Cuadro 1. Seroprevalencia¹ de *Neospora caninum* y asociación a factores de riesgo en bovinos naturalmente infectados en la ceja de selva de Oxapampa, Perú (2012)

	Muestras		Odds Ratio	IC ² 95%	Significancia (p)
	Tomadas (n)	Positivas (%)			
Grupo etario (años)					
>5	103	19.4	1	-	-
3 a 5	178	20.2	1.45	0.60-3.48	0.409
1 a <3	107	15.9	1.69	0.48-6.00	0.417
Procedencia					
Oxapampa	288	17.4	1	-	-
Chontabamba	100	23.0	1.08	0.51-2.25	0.850
Tamaño del hato					
1 a 50	210	16.2	1	-	-
51 a 100	110	22.7	1.58	0.81-3.10	0.184
>100	68	20.6	2.89	1.02-8.18	0.045
Eliminación de restos de animales muertos					
Enterrados	113	17.7	1	-	-
Al aire libre	275	19.3	3.31	1.04-10.49	0.042
N.º de perros / hato					
0	69	15.9	1	-	-
1 a 3	201	12.9	0.56	0.19-1.63	0.287
>3	118	30.5	3.21	1.30-7.88	0.011
Total	388	18.8 ± 3.9			

¹ Prevalencia corregida ± IC al 95%: 18.9 ± 4.0%

² Intervalo de confianza

logística, considerando factores de riesgo aquellos con valores $p < 0.05$ (Boubeta y Varela, 2008).

RESULTADOS

La seroprevalencia de neosporosis en bovinos de la zona de Oxapampa fue de $18.8 \pm 3.9\%$ (Cuadro 1).

La asociación entre las variables independientes (posibles factores de riesgo) y la variable dependiente (seroprevalencia de *N.*

caninum) mostró asociación significativa ($p < 0.05$) para la variable número de perros por hato. La presencia de más de tres perros en un hato representó 3.21 veces más riesgo de infectarse en comparación con el estrato basal (ningún perro por hato). En forma similar, hatos con más de 100 bovinos y la eliminación al aire libre de restos de animales muertos constituyeron factores de riesgo para la infección con *Neospora caninum* (OR de 2.89 y 3.31, respectivamente). Otras variables en estudio (grupo etario y procedencia) no mostraron asociación significativa con la seropositividad de *N. caninum* en bovinos.

DISCUSIÓN

La neosporosis es una enfermedad que está estrechamente involucrada con fallas reproductivas (aborto, mortalidad neonatal) en el ganado bovino. Seroprevalencias de *N. caninum* en otros países revelan cifras de 46, 56 y 61% en Nueva Zelanda, México y Uruguay, respectivamente (Dubey *et al.*, 2007). En el Perú es altamente prevalente, con valores cercanos al 60% en la región de Arequipa (Andresen, 1999).

El nivel de seroprevalencia de *N. caninum* encontrada en el presente estudio ($18.8 \pm 3.9\%$) es moderado e inferior a otros hallazgos en las principales cuencas lecheras del país como Lima, Arequipa y Cajamarca, cuyas seroprevalencias se encuentran entre el 30 y 60% (Andresen, 1999; Cabrera *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2002). Es posible que estas diferencias se expliquen por el tipo de explotación y mecanismo de reemplazo que realizan los hatos lecheros de Oxapampa, los cuales crían a sus animales bajo un sistema semiextensivo y con animales de reemplazo de la misma zona, en contraste al manejo intensivo donde se tiene el ingreso de animales genéticamente mejorados de otras zonas del país y del extranjero, sin que se realicen exámenes que descarten la presencia de *N. caninum*. Hasta el presente, el descarte de este protozoo no es obligatorio para la importación de vacunos.

Asimismo, otro aspecto importante a considerar es el patrón racial. El ganado cebuino y, en alguna medida, sus cruces, se caracterizan por su adaptabilidad a ambientes con temperaturas elevadas y su resistencia a enfermedades parasitarias. Investigaciones en Brasil coinciden en afirmar que hembras Holstein tienen 2.13 veces más oportunidad de ser seropositivas a *N. caninum* que las de raza cebú (Guimarães *et al.*, 2004). No obstante, esta variable no pudo ser evaluada en el presente estudio.

Estudios realizados en bovinos de la selva del Perú son escasos. Rivera *et al.* (2004) encontraron una seroprevalencia no mayor de 2% en bovinos de la selva baja de Pucallpa; sin embargo, en este caso, la población bovina pertenecía a un centro de investigación, caracterizado por ser un hato con diversos grados de cruces con ganado cebú, escasa introducción de animales y ausencia de perros, frenando la posibilidad de infección horizontal. Por el contrario, Quevedo *et al.* (2003) en la selva alta de Amazonas señalan una seroprevalencia de 40.4%, explicada por la presencia habitual de perros en las fincas ganaderas y la introducción de vientres procedentes de zonas como Cajamarca, que tiene un alto índice de infección a *N. caninum*.

La literatura muestra que animales de mayor edad presentan usualmente una seroprevalencia más elevada, pues han tenido mayores posibilidades de tener contacto con el parásito (Jensen *et al.*, 1999; Dyer *et al.*, 2000). Sin embargo, los resultados del presente estudio no mostraron diferencias significativas entre grupos etarios, concordando con lo mencionado por Davison *et al.* (1999), quienes demostraron que el factor edad no es relevante, pero demostraron la relevancia de la transmisión vertical. Por otro lado, la similitud de la seroprevalencia entre los dos distritos podría deberse a que los ganaderos emplean similares prácticas de manejo.

Los resultados demuestran que bovinos pertenecientes a hatos con más de 100 animales son más susceptibles de presentar la enfermedad (Cuadro 1). Observaciones similares fueron presentadas por Quintanilla-Gozalo *et al.* (1999) en ganaderías españolas, quienes encontraron asociación significativa entre el tamaño del rebaño y la presencia de la infección en ganado de aptitud cárnica, no así en ganado lechero, siendo más frecuente (64%) en rebaños de tamaño medio (11-49 animales) que en pequeños y grandes (49%).

La práctica de dejar los restos de animales muertos al aire libre es una práctica cotidiana en la zona que influyó sobre la presencia de neosporosis (Cuadro 1). Esta acción facilita el acceso de perros y cánidos silvestres a restos de abortos y a la ingestión de quistes tisulares con bradizoitos. Los canes infectados pasarían a eliminar ooquistes con las heces, contaminando la pastura y forraje; empero, Fischer *et al.* (2003) no pudieron demostrar asociación con este factor.

La tenencia de tres o más perros representó un riesgo 3.21 veces mayor de infección en el hato que en ausencia de ellos, concordando con otros estudios (Paré *et al.*, 1998; Basso *et al.*, 2001). La presencia de perros en las explotaciones ganaderas representa un factor de riesgo importante, dado que los canes expulsan los ooquistes del parásito en sus heces, facilitando la transmisión horizontal de la neosporosis. Sin embargo, todo indica que 1 o 2 perros no es decisivo, hecho que ha sido corroborado por McAllister *et al.* (1998), al demostrar que son pocos los ooquistes eliminados a partir del día 8 de la infección y que estos son excretados irregularmente por un corto periodo.

El aborto es el principal signo clínico asociado a la neosporosis bovina (Dubey *et al.*, 2006). Los ganaderos de la zona reportaron una baja ocurrencia de abortos, pero ante la carencia de registros fue imposible establecer su incidencia, así como los índices reproductivos. Por otro lado, los abortos en el bovino pueden presentarse como reacción concomitante a otro tipo de patologías como DVB o IBR (Barr *et al.*, 1997; Dubey, 1999, 2003; Anderson *et al.*, 2000), y que los valores serológicos no necesariamente indican que el animal se encuentre desarrollando la enfermedad, ya que esta prueba únicamente indica que los animales estuvieron expuestos a la infección en algún momento de sus vidas (Oviedo *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

- La seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de ceja de selva de la provincia de Oxapampa, Pasco, fue moderada ($18.8 \pm 3.9\%$).
- Los factores de riesgo asociados con la seropositividad de *N. caninum* fueron la presencia de más de tres perros en el hato, la eliminación de restos de animales al aire libre y un tamaño de hato mayor de 100 animales ($p < 0.05$), en tanto que la edad y procedencia no influyeron en el riesgo de presentación de *N. caninum*.

Agradecimiento

El presente estudio fue financiado por el Fondo de Promoción de Trabajo de Tesis de Pregrado del Consejo Superior de Investigaciones-UNMSM (Código: 120801057). Los autores agradecen al personal de la Dirección Agraria Oxapampa por las facilidades prestadas para la ejecución en campo del estudio.

LITERATURA CITADA

1. Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. 2000. Neosporosis in cattle. Anim Reprod Sci 60-61: 417-431. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00117-2
2. Andresen H. 1999. Neosporosis en el Perú y el mundo. Rev Cien Vet Perú 15(4): 11-16.
3. Barr B, Bjerkas I, Buxton D, Conrad P, Dubey J, Ellis J, Jenkis M, et al. 1997. Neosporosis. Report of the international Neospora workshop. Parasitology 19: 120-126.
4. Basso W, Venturini L, Venturini M, Moore P, Rambeau M, Unzaga J, Campero C, et al. 2001. Prevalence

- of *Neospora caninum* infection in dogs from beef-cattle farms, dairy farms, and from urban areas of Argentina. J Parasitol 87: 906-907. doi : 10.1645/0022-3395(2001)087[0906:PONCII]2.0.CO;2
5. **Baszler T, Adams S, Vander-Schalie J, Mathinson B, Kostovic M. 2001.** Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. J Clin Microbiol 39: 3851-3857.
 6. **Boubeta AR, Barela J. 2008.** Estadística práctica para la investigación en ciencias de la salud. Madrid: Netbiblo. 344 p.
 7. **Cabrera M, Ortiz P, Claxton J, Williams D, Trees A. 2000.** Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en ganado vacuno en Perú. En: IV Congreso Peruano de Parasitología. Lima, Perú.
 8. **Daniel W. 1996.** Bioestadística: base para el análisis de la ciencia de la salud. 5ª ed. México: Noriega Editores. 206 p.
 9. **Davison HC, Otter A, Trees AJ. 1999.** Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. Int J Parasitol 29: 1189-1194. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00094-6
 10. **Dubey JP. 1999.** Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol 84: 349-367. doi: 10.1016/S0304-4017(99)00044-8
 11. **Dubey JP. 2003.** Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol 41(1): 1-16. doi: 10.3347/kjp.2003.41.1.1
 12. **Dubey JP, Buxton D, Wouda W. 2006.** Pathogenesis of bovine neosporosis. J Comp Path 134: 267-289. doi: 10.1016/j.jcpa.2005.11.004
 13. **Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. 2007.** Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. Clin Microbiol Rev 20: 323-367. doi: 10.1128/CMR.00031-06
 14. **Dyer RM, Jenkins MC, Kwok OCH, Douglas LW, Dubey JP. 2000.** Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. Vet Parasitol 20: 171-181. doi: 10.1016/S0304-4017(00)00253-3
 15. **Fischer I, Furrer K, Audige L, Fristche A, Giger T, Gottstein B, Sager H. 2003.** The importance of bovine neosporosis for abortion in Switzerland [en alemán]. Schweiz Arch Tierheilkd 145: 114-123.
 16. **Fuchs L, Baldone V, Rojas M, Fort M, Bedotti D, Venturini C, Del Salado IEC. 2005.** Prevalencia serológica a toxoplasmosis y neosporosis en el zorro gris pampeano (*Pseudalopex gymnocercus*) en la provincia de La Pampa (Argentina). Bol Div Téc EEA Anguil. 90 p.
 17. **Gondim LFP, McAllister M, Pitt W, Zemlicka D. 2004.** Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 34: 159-161.
 18. **Guimarães JS, Souza SLP, Bergamaschi DP, Gennari SM. 2004.** Prevalence of *Neospora caninum* antibodies and factors associated with their presence in dairy cattle of the north of Parana state, Brazil. Vet Parasitol 124: 1-8. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.07.002
 19. **Jensen AM, Björkman C, Kjeldsen AM, Wedderkopp A, Willadsen C, Ugglå A, Lind P. 1999.** Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds. Prev Vet Med 40: 151-163. doi: 10.1016/S0167-5877(99)00048-3
 20. **McAllister M, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley W, Wills R, McGuire AM. 1998.** Dogs are definitive host of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 28: 1473-1479. doi: 10.1016/S0020-7519(98)00138-6
 21. **Moore DP, Soler J, Cano DB, Leunda MR, Odeón AC, Paolicchi FA, Campero CM. 2002.** Evaluación de

- anticuerpos anti-*Neospora caninum* en ciervos colorados (*Cervus elaphus*). Sitio Argentino de Producción Animal. [Internet]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ciervos/16-evaluacion_de_anticuerpos_anti.pdf
22. **Municipalidad Distrital de Oxapampa. 2010.** Plan de desarrollo concertado del distrito de Oxapampa 2009-2021. [Internet], [5 de Mayo 2013]. Disponible en: <http://www.munoxa-pampa.com/plandesarrollo/PlanDesarrolloConcertadoDistritoOxapampa.pdf>
 23. **Oviedo T, Betancur C, Mestra A, González M, Reza L, Calonge K. 2007.** Estudio serológico sobre neosporosis en bovinos con problemas reproductivos en Montería, Córdoba, Colombia. *Rev MVZ Córdoba* 12: 929-933.
 24. **Paré J, Fecteau G, Fortin M, Marsolais G. 1998.** Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. *J Am Vet Med Assoc* 213: 1595-1598.
 25. **Puray N, Chávez A, Casas E, Falcón N, Casas V. 2006.** Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. *Rev Inv Vet Perú* 17: 189-194.
 26. **Quevedo J, Chávez A, Rivera H, Casas E, Serrano E. 2003.** Neosporosis en bovinos lecheros en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. *Rev Inv Vet Perú* 14(1): 33-37.
 27. **Quintanilla-Gozalo A, Pereira-Bueno J, Tabares E, Innes EA, González R, Ortega LM. 1999.** Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. *Int J Parasitol* 29: 1201-1208. doi: 10.1016/S0020-7519(99)00084-3
 28. **Rivera H, Benito A, Ramos O, Manchego A. 2004.** Prevalencia de enfermedades de impacto reproductivo en bovinos de la estación experimental de trópico del centro de investigaciones IVITA. *Rev Inv Vet Perú* 15: 120-126.
 29. **Silva P, Chávez A, Rivera H, Casas E. 2002.** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima. *Rev Inv Vet Perú* 13(2): 51-55.
 30. **Thilsted JP, Dubey JP. 1989.** Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. *J Vet Diagn Invest* 1: 205-209. doi: 10.1177/104063878900100301
 31. **Thrusfield M. 1990.** Epidemiología veterinaria. Zaragoza, España: Ed Acribia. 339 p.