



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**

TESIS DOCTORAL

Seroprevalencia y factores de riesgo de la infección por agentes reproductivos del ganado bovino (*Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo y *Neospora caninum*) en explotaciones lecheras y de doble propósito de Ecuador.

Lucía Teresa Guzmán Ordóñez

Córdoba, junio 2017

TITULO: *Seroprevalencia y factores de riesgo de la infección por agentes reproductivos del ganado bovino (Brucella spp., Coxiella burnetii, Leptospira interrogans serovar Hardjo y Neospora caninum) en explotaciones lecheras y de doble propósito de Ecuador*

AUTOR: *Lucía Teresa Guzmán Ordóñez*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS: Seroprevalencia y factores de riesgo de la infección por agentes reproductivos del ganado bovino (*Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo y *Neospora caninum*) en explotaciones lecheras y de doble propósito de Ecuador.

DOCTORANDO/A: Lucía Teresa Guzmán Ordóñez.

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis doctoral que nos ocupa ha sido realizada entre los años 2011 y 2017, tratando sobre la epidemiología de los principales agentes que ocasionan trastornos de tipo reproductivo en el ganado bovino ecuatoriano. Hasta la realización de dicho estudio no existía ningún tipo de información en el país acerca de la difusión y los factores de riesgo asociados a estas infecciones.

El estudio fue desarrollado en varias partes: una primera dedicada al diseño, en el que se planteó cuál sería el mejor método de muestreo considerando la falta de información, infraestructuras y otras dificultades inherentes al área de estudio, y se realizó una revisión bibliográfica inicial a la vez que diferentes entrevistas con representantes del sector bovino para determinar cuáles eran las principales enfermedades que deberían ser incluidas en el estudio.

Durante una segunda fase, la más prolongada en el tiempo, se realizó el muestreo, que abarcó una enorme extensión, hasta el punto de que los resultados obtenidos son representativos de todo el país. Se obtuvieron muestras de las tres áreas continentales diferenciadas del país: la costa, la región andina y la preamazonia. En total de obtuvieron más de 2.600 muestras procedentes de 386 explotaciones.

Obtenidas las muestras, junto con el cumplimiento de la encuesta para obtener datos epidemiológicos, se realizaron los análisis serológicos de los cuatro agentes mencionados en el título. Finalmente, se realizaron los análisis estadísticos y se finalizó con la redacción de la tesis.

Cabe mencionar que la doctoranda ha debido compaginar la tesis con su actividad docente y de gestión en la Universidad Técnica Particular de Loja, donde ha ejercido varios puestos de responsabilidad, ocasionando que a veces la tesis no evolucionara al ritmo inicialmente marcado.

Respecto a las publicaciones, la parte de la tesis referente a *Coxiella burnetii* se publicó en el año 2015 en la revista Preventive Veterinary Medicine, situada en el primer decil ese año.

La parte referente a *Brucella* se ha enviado a la revista de segundo cuartil Tropical Animal Health and Production, y desde el 15 de junio se observa en la página de la revista que las revisiones han sido realizadas, aunque aún no nos han llegado notificación de en qué sentido.

El artículo con acerca de *Neospora* se envió a varias revistas, siendo rechazado y nos encontramos en proceso de modificación antes de remitirlo de nuevo. Finalmente, el artículo sobre *Leptospira interrogans* serovar Hardjo está escrito pero es preciso realizar aún una intensa revisión antes de enviarlo para su publicación.

En cualquier caso, consideramos que la tesis ha producido información de elevada calidad, siendo valiosa para el desarrollo del país.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 30 de junio de 2017

Firma del/de los director/es



Fdo.: Alfonso Carbonero Martínez



Fdo.: Luis Rodrigo Saa

*A Jaime, Ghina Lucía, Ana María y Sara Janeth,
fuente de mi inspiración, fortaleza y apoyo
permanente.*

*A mi madre, con su amor fraterno, sus
consejos y bendiciones que me han
acompañado siempre.*

*A la memoria de mi querido padre, cuanto te
extraño.*

*A Dirce, Wilson, Susana y Ruth por su cariño y
apoyo especialmente durante mi ausencia.*

INDICE

I	INTRODUCCIÓN.....	13
II	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	19
1	<i>Brucella</i>	21
2	<i>Coxiella burnetii</i>	49
3	<i>Leptospira spp</i>	69
4	<i>Neospora caninum</i>	88
III	OBJETIVOS.....	103
IV	MATERIAL Y MÉTODOS.....	106
1	Población en estudio.....	108
2	Determinación del tamaño de la muestra.....	109
3	Diseño del cuestionario epidemiológico y obtención de los datos.....	111
4	Obtención y procesado de las muestras de sangre.....	116
5	Análisis serológicos.....	116
5.1	<i>Brucella spp</i>	116
5.2	<i>Coxiella burnetii</i>	119
5.3	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Hardjo.....	121
5.4	<i>Neospora caninum</i>	125
6	Métodos y análisis estadísticos.....	127
6.1	Eliminación de variables.....	127
6.2	Clasificación y codificación.....	128
6.3	Análisis estadístico.....	128
6.4	Análisis descriptivo.....	128
6.5	Análisis bivariable.....	129
6.6	Análisis multivariable.....	129
7	Diseño del mapa coroplético.....	130
V	RESULTADOS.....	131
1	Análisis descriptivo.....	133
2	Análisis bivariable.....	139

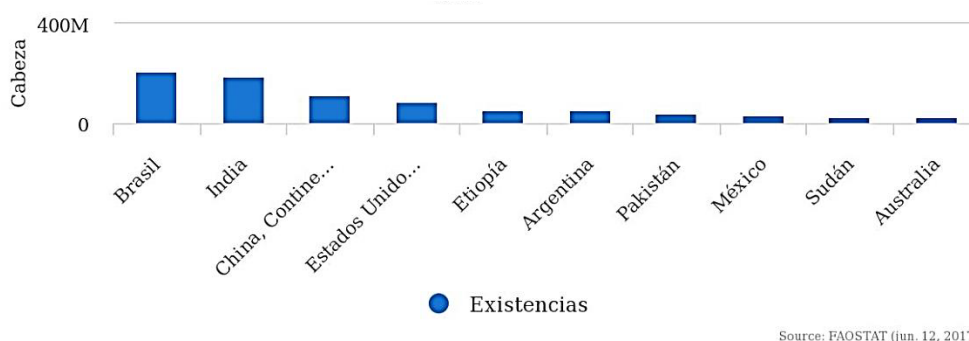
3	Análisis multivariable.....	150
3.1	<i>Brucella</i> spp.....	151
3.2	<i>Coxiella burnetii</i>	152
3.3	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Hardjo.....	153
3.4	<i>Neospora caninum</i>	154
4	Asociaciones entre los distintos agentes.....	155
5	Mapas coropléticos.....	156
VI	DISCUSIÓN	161
VII	CONCLUSIONES	179
VIII	RESUMEN	183
IX	SUMMARY	187
X	AGRADECIMIENTOS	191
XI	BIBLIOGRAFÍA	194

I INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

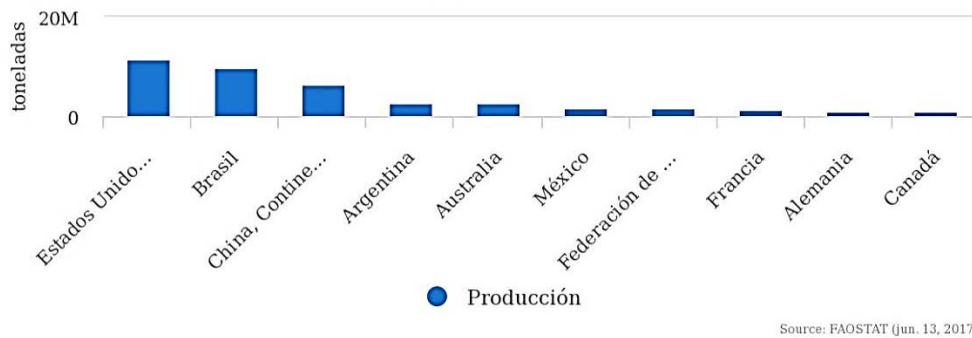
La ganadería bovina constituye una de las principales producciones pecuarias a nivel mundial; en el año 2014 se registraron 1.474.526.581 animales. Los principales países productores de ganado bovino son Brasil con 212.366.132 animales; India (187.000.000); China (113.965.500); Estados Unidos (88.526.000), Etiopía (56.706.389) y Argentina (51.646.544) (Fig. 1).

Fig. 1. Principales países productores de ganado bovino. 2014.



La producción mundial de carne de bovino durante la última década ha registrado un aumento anual del 1,4%. Durante el año 2016 la producción alcanzó los 60,5 millones de toneladas. Se estima que para el año 2017 la producción alcance los 61,3 millones de toneladas y la población bovina 1.008,4 millones de animales. Turquía, India, Paquistán, México y China son los países que más incrementaron su producción entre los años 2007 y 2016 (FIRA, 2017). Estados Unidos, Brasil, China, Argentina, Australia se sitúan actualmente en las primeras posiciones respecto a la producción de carne bovina (Fig.2).

Fig.2 Principales países productores de carne bovina



Con respecto a la producción mundial de leche, en el año 2014 se registró una producción de 652.351.920 toneladas (FAO, 2017). India es el mayor productor con el 18% de la producción total seguido de Estados Unidos, China, Pakistán y Brasil (FAO, 2013). La producción de leche en América Latina representó el 13,71% de la producción a nivel mundial en el año 2011 (FAO, 2012).

En Ecuador, durante la última década, la producción pecuaria contribuyó con el 1,6% al PIB. Se estima que el 48% de la producción pecuaria total (sin considerar las aves), corresponde a la cadena de productos lácteos de origen bovino, un 45% a la cadena de cárnicos (también de origen bovino) y un 7% al resto de especies (MAGAP, 2015). Con respecto a la población pecuaria, el ganado bovino predomina en el sector pecuario con un total de 4.127.311 animales, de los cuales 896.170 corresponden a vacas de ordeño. La producción de leche a nivel nacional es de 5.319.288 litros con un rendimiento medio de 5,94 litros/vaca. Pichincha, ubicada en la región Sierra es la provincia con mayor rendimiento (10,49 litros/vaca), mientras que la provincia costera de Manabí concentra el mayor número animales (879.592), representando el 21,31% del total nacional. Con respecto a la producción de leche por regiones geográficas, la región Sierra tiene la mayor producción con 4.106.855 litros, seguida de la región Costa con 955.272 litros y finalmente la región Oriental y zonas no catalogadas con 256.421 y 740 litros, respectivamente (INEC, 2016).

Con respecto al tipo de explotación, el 12% de los sistemas productivos están orientados a la producción de carne, 19% a la producción de leche y el 69% de doble propósito (MAGAP, 2015); este último sistema generalmente lo

mantienen pequeños y medianos productores por el ingreso económico que perciben diariamente por la venta de leche y/o queso y, eventualmente por la venta de animales para sacrificio o cría. Por otra parte, el sistema de manejo extensivo es el que se observa en la mayor parte de las granjas de producción bovina (Haro, 2003). Cabe señalar la importancia de la participación de los pequeños y medianos productores en la producción nacional correspondiente al 45% y 32% con una media de 11,5 y 25,6 l/explotación/día, respectivamente (FAO, 2012).

Aunque los organismos oficiales encargados de la prevención y control sanitario de Ecuador, han desarrollado múltiples esfuerzos en la última década, aún no se conoce en profundidad la situación sanitaria en relación a la mayoría de enfermedades infecciosas que afectan al ganado bovino. Recientemente Ecuador fue declarado País libre de Fiebre Aftosa tras un programa oficial de erradicación basado en vacunación. Desde el año 2009 se implementó el Programa Nacional de Control de la brucelosis bovina (AGROCALIDAD, 2009), de carácter voluntario; no obstante, la falta de participación de los ganaderos y las dificultades para el diagnóstico de la enfermedad no han permitido hasta la actualidad lograr el avance en la ejecución del programa y, consecuentemente, la reducción de la prevalencia de esta enfermedad en las explotaciones bovinas. Las pérdidas económicas causadas por la brucelosis bovina en el país se han estimado en cinco millones de dólares al año (SESA, 2005).

Respecto a otras enfermedades de importancia productiva y económica como leucosis bovina, lengua azul, tuberculosis o las que ocasionan enfermedades de tipo reproductivo, apenas se dispone de información epidemiológica.

La existencia de enfermedades reproductivas en la producción bovina supone un factor limitante para su desarrollo debido a que ocasiona graves pérdidas económicas (Rivera y cols., 2004). Las enfermedades infecciosas y parasitarias suponen la principal etiología asociada a problemas reproductivos en los sistemas ganaderos. Destacan la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), la Diarrea Vírica Bovina (DVB) y las infecciones provocadas por *Brucella* spp.,

Leptospira spp., *Coxiella burnetii* y *Neospora caninum* (Chiebao y cols., 2015; Mazeri y cols., 2012; Repiso y cols., 2005). De manera adicional al impacto económico en la producción ganadera, la brucelosis, fiebre Q y leptospirosis son enfermedades zoonóticas con un grave impacto en la salud pública (Chiebao y cols., 2015).

Se han realizado algunos estudios que confirman la importancia económica de estas enfermedades. El costo anual en un rebaño infectado de 50 vacas se estimó en 2.421 dólares para DVB y 2.304 dólares para neosporosis (Rivera y cols., 2004). En América Latina, las pérdidas ocasionadas por la brucelosis bovina alcanzan los 270 millones de dólares (ICA, 1999). Por otra parte, se estimó que el promedio de abortos ocasionados por leptospirosis alcanza el 5% y el intervalo entre partos se incrementa a 132 días (Parvez y cols., 2015).

En Ecuador existen estudios acerca de la difusión de agentes reproductivos como el Herpesvirus Bovino tipo 1, el virus de la Diarrea Vírica Bovina (Carbonero y cols., 2011; Saa y cols., 2012) o especies del género *Brucella* (Poulsen y cols., 2014). Sin embargo, es prácticamente desconocida la difusión de otros importantes agentes que producen signos reproductivos descritos en el ganado bovino como *Neospora caninum* o especies del género *Leptospira* e incluso la existencia de *Coxiella burnetii* en ganado bovino. De igual forma, la diversa y peculiar situación de Ecuador, con zonas andinas de alta montaña, zonas de costa y zonas pre-amazónica plantean el interrogante sobre si la prevalencia y los factores de riesgo que condicionan estas infecciones serán distintos de los descritos en otras zonas.

II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1 *Brucella* spp.

La brucelosis es causada por una bacteria Gram-negativa del género *Brucella*. Hasta ahora, se han reconocido diez especies en el género, agrupadas de acuerdo a sus preferencias por el hospedador primario: *B. abortus*, bovinos; *B. melitensis*, ovinos y caprinos; *B. suis*, cerdos; *B. canis*, caninos; *B. neotomae*, ratas del desierto; *B. inopinata* en aislados humanos; *B. pinnipedialis* y *B. ceti* en mamíferos acuáticos y *B. microti* en el topo de los campos (*Microtus arbalis*) (Poulsen y cols., 2014).

Hipócrates describió síntomas compatibles a la brucelosis en personas que vivían en el litoral mediterráneo, pero no fue hasta 1886 cuando David Bruce, un médico británico, fue enviado a Malta a estudiar la causa de unas fiebres recurrentes que afectaban a los soldados pues existía mucha confusión sobre su origen. De hecho, los nombres que se le otorgaron a la enfermedad fueron numerosos: fiebre mediterránea gástrica remitente; fiebre remitente; fiebre gastro-biliosa; fiebre sudoral; fiebre miliar; fiebre complicada; fiebre tifoidea intermitente; fiebre tifosa; fiebre tifoidea atípica; ileo-tifus de forma sudoral; fiebre tifo-malárica; fiebre continua epidémica; fiebre mediterránea; fiebre de Malta; fiebre de Gibraltar; fiebre Napolitana; entre otras (Hughes, 1896).

En 1887, Bruce, su esposa y el analista de la sanidad pública de Malta, Guiseppe Caruana, descubrieron y cultivaron un micrococo al que denominaron *Micrococcus melitensis* y señalaron que causaba la enfermedad; sin embargo, no descubrieron cómo ocurría la infección. Simultáneamente, el veterinario danés Bernhard Bang había aislado una bacteria a la que denominó *Bacillus abortus* en el exudado uterino de una vaca que había sufrido abortos.

En 1904, Temistokles Zammit descubrió la relación entre el *Micrococcus* y el consumo de la leche de cabra, lo que causó numerosos problemas en la población maltesa, pues se negaban a creer que sus cabras fueran las causantes de una enfermedad en humanos. De hecho, se prohibió la venta de leche no hervida en

hoteles y restaurantes, pero ello no evitó un mercado negro de la leche de cabra (Wyatt, 2013).

El hallazgo fundamental para el conocimiento de la brucelosis fue logrado en 1918 por Alice Evans, bacterióloga norteamericana, quien comprobó la similitud entre el micrococo de Bruce y el bacilo de Bang desde los puntos de vista morfológico, inmunológico y de cultivo. Sus hallazgos condujeron a la obligatoriedad de la pasteurización en la leche para consumo humano (Colwell, 2000; Seleem y cols., 2010).

1.1. Etiología.

El género *Brucella* pertenece a la familia Brucellaceae, orden Rhizobiales, clase alfa proteobacteria al igual que *Agrobacterium*, *Bartonella*, *Ochrobactrum*, *Rhizobium*, *Rhodobacter* y *Rickettsia*. La clasificación tradicional de *Brucella* se mantiene actualmente y se basa en las características fenotípicas de la bacteria y el hospedador habitual o preferencial (Vega López y cols., 2008; Rodríguez Zapata y Solera Santos, 2014) esta clasificación se puede observar en el cuadro 1.

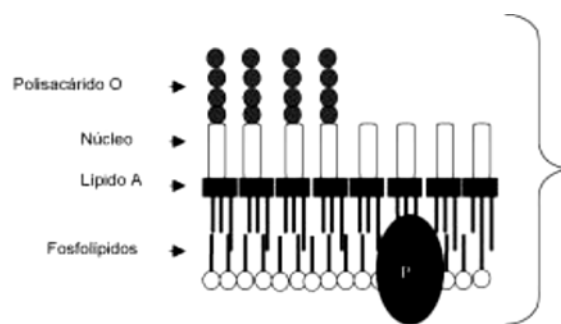
Cuadro 1. Clasificación tradicional y hospedador de las especies de *Brucella*.

Especie	Biovares	Hospedador preferencial
<i>B. abortus</i>	1-6,9	Bovino
<i>B. melitensis</i>	1-3	Cabras, ovejas
<i>B. suis</i>	1-3	Cerdo
<i>B. canis</i>	-	Perro
<i>B. ovis</i>	-	Oveja
<i>B. neotomae</i>	-	Ratas
<i>B. ceti</i>	-	Mamíferos marinos
<i>B. pinnipedialis</i>	-	Zorro
<i>B. inopinata</i>	-	Aislados humanos (infección de implante mamario)
<i>B. microti</i>	-	Topo

Brucella abortus al igual que otros miembros del género *Brucella*, es un cocobacilo Gram negativo, intracelular facultativo, de tamaño pequeño (0.4-3 μm), no tiene cápsula, flagelo, endosporas ni plásmidos nativos, de crecimiento lento, son oxidasa y catalasa positivos y no fermentan los azúcares (Vega López y cols., 2008; Olsen y Tatum, 2010; Rodríguez Zapata y Solera Santos, 2014). Por su aspecto en las colonias obtenidas en medio sólido se clasifican como lisas (S) o rugosas(R), *B. abortus* corresponde al grupo de las lisas; esto se debe a la expresión del lipopolisacárido LPS-S en la superficie de la bacteria el mismo que está asociado con la virulencia de la bacteria (Castro y cols., 2005; Glynn, 2008).

La cubierta de *Brucella* está conformada por una membrana externa de estructura antigénica compleja y rica en fosfatidilcolina (Rodríguez Zapata y Solera Santos, 2014). Las proteínas de la membrana externa están fuertemente asociadas al lipopolisacárido LPS-S que es el componente más abundante, conocido también como endotoxina, es el responsable de la reacción antígeno-anticuerpo que se utiliza en las pruebas de diagnóstico serológico. El LPS-S (figura 1) comprende tres estructuras: 1) el lípido A adosado en la membrana, es un glicolípido que contiene glucosamina y diaminoglucosa, 2) el núcleo, es un oligosacárido de ubicación intermedia y contiene glucosa, manosa y ácido 3, deoxi-D-mano-2 octulosónico (KDO) y, 3) el polisacárido O (PSO) se lo conoce también como cadena O y modula la supervivencia del germen *in vivo*, comportándose como un factor de virulencia (Castro y cols., 2005; Rodríguez Zapata y Solera Santos, 2014).

Figura 1. Esquema de la membrana externa de la pared celular de *Brucella abortus*.



Tomado y adaptado de (Castro, HA.; González y Prat, 2005)

La membrana citoplasmática interna está rodeada de una capa de proteoglicano asociada con la membrana externa. Algunas proteínas citoplasmáticas forman parte del antígeno denominado CP, las mismas que son de interés diagnóstico al ser utilizadas en pruebas de ELISA; estas proteínas son: glicoproteína A2 que es termorresistente, una proteína de 17 kDa, involucrada en la síntesis de riboflavina, y aparece en la fase activa de la infección y, finalmente la proteína periplásmica BP26 (Castro y cols., 2005).

B. abortus tiene dos cromosomas circulares que codifican aproximadamente 3.2 Mb. *B. abortus* en base a sus propiedades bioquímicas, fenotípicas y antigénicas se ha dividido en siete biovariedades de las cuales 1, 2, 3, 4 y 9 son las más reportadas; en América Latina, la biovariedad 1 es la más frecuente (Olsen y Tatum, 2010; Aparicio, 2013).

1.2. Brucelosis en humanos.

Considerada como una enfermedad desatendida, esta zoonosis es una de las más comunes en todo el mundo con más de 500.000 casos humanos notificados anualmente (Flores Castro, 2010; Seleem y cols., 2010). Brucelosis es prevalente en países de la cuenca mediterránea (Portugal, España, sur de Francia, Italia, Grecia, Turquía) Norte y Este de África, Centro y Sur América, Asia, El Caribe y Medio Oriente (Seleem y cols., 2010; Kim y cols., 2017).

Generalmente la infección en humanos resulta del contacto directo con tejidos o sangre de animales infectados o por consumo de productos animales contaminados, entre ellos leche y subproductos lácteos no pasteurizados (Poulsen y cols., 2014; Figueiredo y cols., 2015). La brucelosis puede ser además una enfermedad ocupacional: los trabajadores de mataderos y granjas, veterinarios, carniceros están expuestos a inhalar aerosoles contaminados en los lugares de faenamiento, comercialización o sectores donde la infección es endémica (Rivers y cols., 2006; Seleem y cols., 2010); las infecciones en laboratorio por *Brucella* spp. son las más comunes y se estima que representan hasta el 2% de infecciones adquiridas en laboratorio (Yagupsky y Baron, 2005; Rivers y cols., 2006; Seleem y

cols., 2010). La transmisión directa de persona a persona es muy rara, sin embargo se han reportado casos de transmisión posterior a la transfusión de sangre, trasplante de médula ósea, por contacto sexual e inclusive por vía transplacentaria, durante el parto o la lactancia materna (Arroyo Carrera y cols., 2006; Franco y cols., 2007).

B. abortus, *B. melitensis* y *B. suis* afectan principalmente al humano. La infección producida por *B. melitensis* se observa con mayor frecuencia y es la más grave (Aparicio, 2013). Después de infectar al huésped, las bacterias son fagocitadas por los polimorfonucleares y macrófagos; si estas células infectadas no son eliminadas por los macrófagos, las bacterias llegan por vía linfática a los ganglios linfáticos más cercanos al lugar de infección, desde allí invaden el torrente sanguíneo donde son fagocitadas por macrófagos y polimorfonucleares y transportadas a los diferentes órganos del cuerpo humano en los cuales pueden continuar multiplicándose a través de los fagocitos circulantes y tisulares (Castro y cols., 2005; Vega López y cols., 2008; Rodríguez Zapata y Solera Santos, 2014). El periodo de incubación normalmente es de 1 a 3 semanas, sin embargo, pueden pasar varios meses antes de que se presenten los primeros síntomas; esta enfermedad tiene tendencia a la cronicidad con sintomatología que puede ser debilitante e incapacitante y deteriora la calidad de vida del paciente (Rivers y cols., 2006; Franco y cols., 2007; Seleem y cols., 2010).

Entre los síntomas comunes de la brucelosis están la característica fiebre ondulante y/o recurrente, la temperatura puede variar de 37 °C a 40 °C; sudoración nocturna, dolor articular o muscular, escalofríos, debilidad, malestar, además de insomnio, anorexia, cefalea, artralgia, estreñimiento, impotencia sexual, nerviosismo y depresión (Acha y Szyfres, 2003; Ron Roman, 2003; Seleem y cols., 2010). De acuerdo al sitio de infección y a la cronicidad de la enfermedad, se pueden afectar varios órganos y sistemas del huésped y presentar artritis, endocarditis, encefalitis, meningitis, orquitis, epididimitis, prostatitis, glomerulonefritis, abscesos renales, o afecciones en el sistema respiratorio como bronquitis y neumonía (Acha y Szyfres, 2003; Figueiredo y cols., 2015; Kim y cols., 2017).

Las manifestaciones clínicas que presenta la brucelosis en humanos puede confundirse con la sintomatología de otras enfermedades dificultando el diagnóstico clínico, por ello es necesario prestar atención en el registro detallado de los datos en la historia clínica y en especial de la información epidemiológica: exposición o contacto, ingesta de productos lácteos contaminados, contacto con animales infectados, lugar de trabajo, viajes a zonas endémicas (Franco y cols., 2007).

El diagnóstico se confirma con pruebas de laboratorio las mismas que se enfocan a la identificación de la bacteria o la detección de anticuerpos. El aislamiento de *Brucella* se realiza en cultivos de sangre, médula ósea, ganglios linfáticos, hígado, o del fluido cerebroespinal. El aislamiento se realiza frecuentemente a partir de hemocultivo que es la prueba estándar para el diagnóstico de brucelosis en humanos; la técnica más utilizada es la de Ruiz Castañeda en la que la incubación de la bacteria se realiza en un medio doble (caldo y agar triptosa) por un tiempo no menor a 30 días debido al crecimiento lento de las bacterias de este género, habitualmente ocurre entre los siete y veintiún días hasta los 35 días. En la actualidad se utilizan además la técnica de lisis-centrifugación y sistemas de hemocultivo automáticos de aislamiento rápido que permiten la identificación entre 60 y 160 horas, con más del 95% de cultivos positivos antes del séptimo día de incubación, entre ellos tenemos Bactec, BAC/ALERT, Vital Aer (Castro y cols., 2005; Franco y cols., 2007; Vega López y cols., 2008; Seleem y cols., 2010; Rodríguez Zapata y Solera Santos, 2014).

Los métodos serológicos se basan en la determinación de anticuerpos; en las dos primeras semanas aparecen en su orden anticuerpos específicos anti-*Brucella* del tipo IgM e IgG los mismos que por su actividad aglutinante permiten ser detectados por las pruebas de aglutinación en tubo SAT y Rosa de Bengala (prueba más utilizada por su rapidez y bajo costo). La prueba de Coombs detecta anticuerpos IgG incompletos o univalentes que tienen poca o nula capacidad aglutinante y generalmente están presentes en los casos crónicos. La prueba de ELISA permite detectar y cuantificar los anticuerpos IgG, IgM e IgA contra el

lipopolisacárido de *Brucella*. Rosa de Bengala se recomienda utilizar en comunidades rurales en donde no es posible utilizar la aglutinación en tubo SAT, mientras que en áreas endémicas y en individuos con recidivas de la enfermedad la técnica de ELISA permite detectar anticuerpos totales, completos como incompletos (Ron Roman, 2003; Castro y cols., 2005; Vega López y cols., 2008; Rodríguez Zapata y Solera Santos, 2014).

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) también es un método que se ha desarrollado para el diagnóstico; entre las ventajas de esta técnica permite la diferenciación de especies, mayor sensibilidad frente al cultivo, además de contar con un resultado rápido. Los altos costos del ensayo pueden restringir su uso y entre una de sus limitaciones se cita que no permite identificar si existe infección activa o curación de la enfermedad (Franco y cols., 2007; Vega López y cols., 2008; Rodríguez Zapata y Solera Santos, 2014).

El tratamiento se basa en esquemas recomendados por la Organización Mundial de la Salud y requiere de un mínimo de seis semanas de administración combinada de doxiciclina más gentamicina o rifampicina (Franco y cols., 2007; Glynn, 2008; Vega López y cols. 2008).

1.3. Aspectos epidemiológicos de la brucelosis bovina.

Brucelosis bovina es una enfermedad zoonótica, causada especialmente por *Brucella abortus*. Clínicamente la enfermedad se caracteriza por presentar abortos, retención de placenta, metritis en las hembras gestantes, epididimitis y orquitis en los machos (Seleem, Boyle y Sriranganathan, 2010; Dorneles, Sriranganathan y Lage, 2015). En áreas endémicas es un grave problema de salud pública y responsable de graves pérdidas económicas en la producción animal (Borba y cols., 2013; Chy y Chhabra, 2013; Dorneles y cols., 2015). En vacas infectadas con *Brucella* el intervalo interparto aumenta y con ello disminuye la vida productiva del animal, se reduce el número de terneros nacidos y la producción de leche (Borba y cols., 2013). *Brucella* frecuentemente se localiza en la glándula mamaria y causa mastitis; aunque no se observan signos clínicos inicialmente (Olsen y Tatum,

2010; Rodríguez Zapata y Solera Santos, 2014), la reducción de la producción láctea se estima en 25% en vacas infectadas (Acha y Szyfres, 2001). De acuerdo a un estudio realizado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA, 1999; Rivera y cols., 2003) se estima en 270 millones de dólares norteamericanos las pérdidas económicas ocasionadas por la brucelosis en América, valor que se basa en los siguientes porcentajes de pérdida: 47% producción de leche, 41% producción de crías y 12 % costos de reposición. En Ecuador las pérdidas anuales por la brucelosis bovina se estima en 5,5 millones de dólares debido a abortos, reducción de la producción de leche y mortalidad (AGROCALIDAD, 2009).

La brucelosis bovina está distribuida en todo el mundo y se reporta en los países donde se explota ganado bovino; es endémica y constituye un grave problema en algunos países de América Latina, África, oeste de Asia y del Mediterráneo en especial en países con bajos recursos económicos (Rivers y cols., 2006; Dorneles y cols., 2015). En países del sur de Europa se reportan prevalencias inferiores al 1%, mientras que en países del centro y norte de Europa, Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelandia se considera erradicada o libre a la infección por *B. abortus* (Rivers y cols., 2006; Aparicio, 2013). En Norteamérica, la brucelosis bovina es prevalente en el norte y centro de México, mientras que en Estados Unidos si bien todos los estados están declarados libres de *B. abortus* en bovinos, la infección persiste en rebaños de animales salvajes que ocasionalmente provocan una diseminación en rebaños bovinos (Aparicio, 2013). En todos los países de América Central existe *B. abortus* con prevalencias que van del 4 al 8%. El Salvador presenta una prevalencia menor al 1% mientras que Guatemala y Costa Rica son los países con mayor prevalencia (Moreno, 2002; Rivers y cols., 2006). En Sudamérica existen varios países que han implementado planes de erradicación en las últimas décadas. Se reportan prevalencias de 0,02% en Chile, 0,04% en Uruguay, 2,10% en Argentina, 2,27% Bolivia, 0,06% a 10,20% Brasil, 3,15% en Paraguay (Aznar y cols., 2014). En un estudio realizado en Colombia, Rivera y cols. (2003) determinaron una prevalencia de 19,7%.

En el Ecuador la brucelosis bovina es considerada una enfermedad endémica y de mucha importancia por el impacto que causa en la salud pública y

por las restricciones al comercio nacional e internacional de productos y derivados bovinos (AGROCALIDAD, 2009). La brucelosis bovina en Ecuador se encuentra ampliamente difundida y su presencia se reporta aproximadamente desde la década del 50; en el periodo 1954-1956 la Dirección Ganadera, entidad oficial de la época, reportó un 15,43% de animales positivos por seroaglutinación y, el 12,10 % de sospechosos en un estudio que realizó en 14600 bovinos de la sierra y costa del país (Szyfres y cols. 1957). En el año 1979 el Programa de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura y Ganadería realizó una encuesta serológica en 15 provincias de la costa y sierra del país, los resultados determinaron niveles de prevalencia entre 1.3 y 10.6% (Tabla 1). Posteriormente, investigaciones serológicas locales realizadas como tesis de grado en algunas universidades del país determinaron del 0,2 al 13,2% y, en el año de 1989 el 0,22% de animales positivos en la provincia amazónica de Morona Santiago.

Tabla 1. Prevalencia de brucelosis bovina en Ecuador 1979.

Provincias	Número de muestras	Resultados de Laboratorio*		
		Positivos	Sospechosos	Negativos
Carchi	1199	56	151	992
Imbabura	1051	16	35	1000
Pichincha	1585	77	168	1340
Cotopaxi	765	38	20	707
Tungurahua	964	44	60	858
Chimborazo	613	19	85	509
Bolívar	653	3	6	644
Cañar	825	13	17	795
Azuay	754	2	6	746
Loja	2050	18	80	1952
Esmeraldas	1427	52	63	1312
Manabí	970	46	32	892
Guayas	1001	47	93	861
Los Ríos	412	13	35	364
El Oro	1204	51	38	1115
TOTAL	15473	495	889	14087

Fuente: PNSA-MAG (1979) citado por AGROCALIDAD (2009)

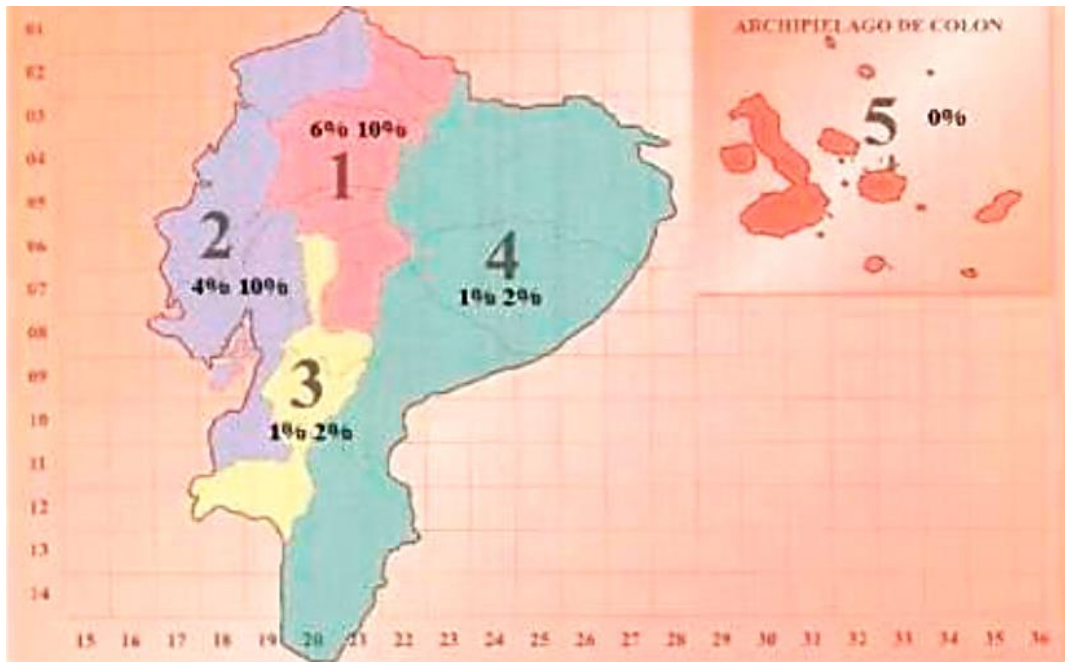
El análisis de la encuesta serológica realizada a nivel regional en el año 1979 y los resultados de estudios realizados en el periodo 2004 - 2009 a través de convenios de la entidad oficial con algunas organizaciones de productores y empresarios de la industria láctea, confirmaron la variabilidad de la prevalencia de la enfermedad en el país (0,07 a 8,80%) y, sirvieron de base para caracterizar regiones epidemiológicas y establecer los mecanismos de control adecuados.

El Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina establece cinco regiones epidemiológicas (Figura 2) las mismas que se describen a continuación:

- **Región Uno de Alta Prevalencia**
Comprende las provincias del norte de la sierra ecuatoriana (Carchi, Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua y Chimborazo) con una prevalencia del 1.97 al 10.62%.
- **Región Dos de Alta Prevalencia**
Conformada por las provincias de la región litoral (Esmeraldas, Manabí, Santa Elena, Guayas, Los Ríos, El Oro y Santo Domingo de los Tsáchilas), con una prevalencia entre 4.2% y 10.62%.
- **Región Tres de Baja Prevalencia**
Con una prevalencia de 1.3 al 2.6%.comprende las provincias del centro y sur de la sierra (Bolívar, Cañar, Azuay y Loja)
- **Región Cuatro de Baja Prevalencia**
Comprende las provincias amazónicas. No se dispone de información pero se estima que dada la similitud de los sistemas de producción existentes, la prevalencia debe ser igualmente baja.

- Región Cinco Indemne
En 1997 se realizó un estudio en 507 muestras de 114 explotaciones bovinas de las islas Santa Cruz, Isabela, San Cristóbal y Floreana, el resultado negativo a la prueba Rosa de Bengala, determinó considerar a las Islas Galápagos como zona indemne a brucelosis bovina.

Figura 2. Regiones epidemiológicas de brucelosis bovina.



Fuente: AGROCALIDAD (2009).

Estudios recientes en diferentes localidades al norte del país determinan la presencia de brucelosis bovina con una prevalencia de 7,2% (Poulsen y cols., 2014; Rodríguez y cols., 2015).

Hospedadores.

El bovino es el hospedador preferencial de *B. abortus* sin embargo también puede infectar a otros animales domésticos y de vida silvestre que pueden actuar a su vez como reservorios (Godfroid y cols., 2011).

Los rumiantes en general son susceptibles a *B. abortus* y en especial búfalos, camélidos, cérvidos, cápridos y óvidos. Los camélidos sudamericanos como la llama (*Lama glama*), alpaca (*Lama pacos*), guanaco (*Lama guinicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) también se han descrito como animales afectados por *B. abortus* (Aparicio, 2013).

La permanencia de reservorios de vida silvestre permite la transmisión a bovinos domésticos y con ello la persistencia de *B. abortus* dificultando la eficacia de los programas de control y erradicación (Olsen y Tatum 2010). Es importante indicar que la infección de perros por *B. abortus* se ha señalado en condiciones experimentales y de campo (Baek y cols., 2003; Aparicio, 2013).

Factores de riesgo relacionados con el hospedador.

La susceptibilidad de los animales a la brucelosis depende de su nivel de inmunidad, resistencia natural, edad y las condiciones de estrés a las que estén sometidos (Tesfaye y cols., 2011).

Aunque la respuesta inmunitaria de los bovinos frente a la exposición de enfermedades es variable y se ha atribuido a la genética, la susceptibilidad o resistencia a la brucelosis no está relacionada a las razas bovinas (Aparicio, 2013). Las vacas de raza lechera presentan mayor prevalencia por el contacto permanente entre los animales y consecuentemente el contagio de la enfermedad (Aparicio, 2013). En el 80% de los animales infectados, *Brucella* se localiza en los ganglios linfáticos supramamarios y en la glándula mamaria; las bacterias serán eliminadas a través de la leche durante toda la vida del animal (Hamdy y Amin, 2002; Seleem y cols., 2010) transmitiendo además al ternero. La placenta tanto en abortos como en partos aparentemente normales poseerá una alta carga bacteriana (Seleem y cols., 2010).

Factores de riesgo relacionados con el manejo y medio ambiente.

Los factores de riesgo para la infección por *Brucella* y la permanencia de la enfermedad, están muy relacionados con diversas prácticas de manejo, sistemas de producción, zonas agroecológicas, contacto con animales silvestres (reservorios), condiciones climáticas entre otras (Godfroid y cols., 2011; Chy y Chhabra, 2013).

El movimiento de los animales debido a las exposiciones y ferias ganaderas o el ingreso de animales al rebaño sin un diagnóstico preliminar constituyen factores de riesgo para el contagio y diseminación de la enfermedad (Aparicio, 2013). El sistema de manejo intensivo en los rebaños de producción láctea favorece el contacto entre los animales y la transmisión de animales infectados a animales sanos. Respecto a las prácticas de manejo reproductivo el uso de semen infectado en la inseminación artificial constituye un factor de transmisión de la enfermedad en el hato ganadero. Una inadecuada disposición o la eliminación de restos o fetos abortados, descargas uterinas, placenta, secreciones o productos del parto de vacas infectadas en las instalaciones o pastizales generalmente contaminan el alimento y agua de bebida e influyen en la diseminación de la enfermedad (Olsen y Tatum, 2010; Aparicio, 2013; Chy y Chhabra, 2013). Las condiciones del clima como la humedad favorece la supervivencia del patógeno en el medio ambiente, se ha descrito que puede sobrevivir entre 60 y 140 días en suelo húmedo (Ron Roman, 2003); de igual manera las sequías u estaciones secas ocasionan estrés en los animales haciéndolos más susceptibles a las enfermedades

Factores de riesgo relacionados con el agente.

En las investigaciones realizadas en las últimas décadas sobre la virulencia de *Brucella*, se reconoce su extraordinaria capacidad para provocar una baja activación de la respuesta inmune y la capacidad de intervenir en procesos claves de la fisiología celular del huésped (Godfroid y cols., 2011).

La conformación del LPS y la supervivencia de la bacteria en una estructura celular segura como el retículo endoplásmico son los principales factores

responsables. Las moléculas que conforman el LPS de la membrana externa de la bacteria, expresan una baja actividad estimulante y toxicidad para las células, permitiendo que la bacteria alcance el nivel adecuado de replicación antes de la activación de los mecanismos de defensa por parte del huésped. El lípido A del LPS de *B. abortus* tiene diaminoglucosa (en lugar de glucosamina), los grupos asilos son más largos y están unidos al núcleo por enlaces simples de amida; esta estructura reduce las propiedades relacionadas con endotoxinas típicas de los lipopolisacáridos y consecuentemente presenta menor actividad y toxicidad. Otro factor importante del LPS de *B. abortus* es la cadena O que parece intervenir en la respuesta antimicrobiana al impedir la síntesis de mediadores inmunes (Fugier y cols., 2007).

Otro importante mecanismo de virulencia de *Brucella* son dos componentes: BvrR / BvrS, (*Brucella* virulence regulator por sus siglas en inglés) que se requieren para la modulación del citoesqueleto de la célula huésped durante la invasión y replicación de *Brucella*, y para la regulación de la expresión de proteínas de la membrana externa que intervienen directamente en los procesos de virulencia anteriormente descritos (Fugier y cols., 2007; Poester y cols., 2013).

Contagio.

La principal vía de entrada de *Brucella* es a través de la mucosa oronasal. La mayoría de los animales se infectan por ingestión de alimentos y agua contaminados o por inhalación de polvo de las instalaciones con microorganismos presentes en fetos o restos de abortos, membranas fetales y descargas uterinas, así como por el lamido de secreciones vaginales, genitales y de los becerros recién nacidos de vacas infectadas (Rivers y cols., 2006; Tesfaye y cols., 2011).

Los animales infectados excretan gran cantidad de bacterias en los productos de abortos contaminando el suelo, el agua de canales y arroyos, y corrales (Castro y cols., 2005). *Brucella* se elimina a través de la leche de vacas infectadas y es clave en la transmisión a los terneros. Se debe considerar además que durante el

ordeño se contaminan las copas que se utilizan y si no existe un adecuado manejo sanitario es probable que la bacteria se transmita a otros animales (Aparicio, 2013). Se ha estimado que un 60% a 70% de los terneros nacidos de madres infectadas nacen con la infección. Factor importante si se considera que las terneras pueden infectarse durante el nacimiento al cruzar el canal del parto o al consumir el calostro y la leche; de ellas un bajo porcentaje permanecerán infectadas, serán negativas a las pruebas serológicas, abortarán en la primera gestación y aunque las siguientes gestaciones lleguen a término, la infección uterina y mamaria se repiten, convirtiéndose en fuente de infección permanente (Aparicio, 2013).

No se acepta que la vía venérea tenga importancia epidemiológica en la transmisión de la enfermedad, los toros infectados es poco probable que transmitan la enfermedad pero sí el semen infectado y utilizado en la inseminación artificial (Tesfaye y cols., 2011; Aparicio, 2013).

1.4. Patología.

Una vez que las bacterias ingresan al organismo principalmente por la mucosa oronasal, son fagocitadas por fagocitos especializados que se encuentran debajo de la submucosa e independientemente de la vía de entrada, las bacterias son transportadas hasta los ganglios linfáticos más próximos al lugar de entrada (Olsen y Tatum, 2010; Aparicio, 2013). La respuesta de los ganglios linfáticos se expresa en una hiperplasia reticuloendotelial y linfática que puede persistir durante meses. Después de un breve período de bacteriemia si las bacterias no son destruidas se localizan y pueden sobrevivir largos períodos de tiempo en el interior de las células fagocíticas (Rivers y cols., 2006; Olsen y Tatum, 2010). En los fagosomas de los macrófagos, *Brucella* sobrevive y se multiplica, inhibiendo la fusión del fagosoma que contiene la bacteria y el lisosoma, mediante la acidificación rápida del medio (Castro y cols., 2005; Rivers y cols., 2006; Carvalho y cols., 2010). En células fagocíticas no profesionales, la internalización de *B. abortus* se asocia al dominio extracelular de la proteína tirosina quinasa y tiende a

localizarse dentro del retículo endoplásmico rugoso (Corbel, 1997; Rivers y cols., 2006).

La bacteriemia ocurre periódica y transitoriamente en el ganado con infección crónica, sin embargo el número de bacterias presentes en la sangre es bajo, *B. abortus* se aísla raramente de las muestras de sangre obtenidas del ganado seropositivo.

El endometrio grávido y la placenta fetal bovina son ricos en eritriol, azúcar que promueve el crecimiento de *B. abortus* y es metabólicamente preferido sobre la glucosa (Olsen y Tatum, 2010). Por otra parte, las moléculas de manosa que presenta el extremo terminal del LPS de *B. abortus*, favorecen la adherencia a los receptores de manosa que poseen los fagocitos mononucleares del huésped y las células de la placenta, lo que sumado al tropismo de estas bacterias por el eritritol placentario bovino, hace que las bacterias tengan especial afinidad por el tracto reproductivo y consecuentemente la proliferación de las bacterias proliferan en los trofoblastos de la placenta que rodean al feto (Rivers y cols., 2006). La principal manifestación clínica de la infección aguda en los animales es el aborto durante el último tercio de la gestación con retención de placenta y metritis o el nacimiento de animales prematuros poco viables (Acha y Szyfres, 2003; Ficht, 2003; Rivers y cols., 2006; Seleem y cols., 2010). En bovinos machos provoca alteraciones testiculares y una disminución de la fertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en los testículos y el epidídimo (Rivers y cols., 2006).

Respuesta Inmune.

Debido a que *Brucella* es un parásito intracelular, la activación de la inmunidad mediada por células es el mecanismo efector más relevante en la protección frente a este patógeno. El interferón gama (INF- γ), citoquina secretada por las células T CD4⁺ de tipo Th1, estimula tanto la actividad bactericida de los macrófagos como la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺ (Rivers y cols., 2006). Las citoquinas son actores clave en la protección contra la brucelosis, actúan en la respuesta inmune innata y adaptativa (Figueiredo y cols., 2015).

Inmunidad natural. En estados tempranos de la infección por *Brucella*, el rol de la respuesta innata es reducir el número inicial de bacterias promoviendo una respuesta Th1 en el huésped. En esta fase, juegan un rol importante en la respuesta frente a la invasión de *Brucella*, los macrófagos, los neutrófilos, las células Natural Killer (NK) y el complemento (Golding y cols., 2001; Rivers y cols., 2006). Los macrófagos actúan como células fagocíticas y presentadoras de antígenos en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés) a linfocitos T, promoviendo de esta manera la respuesta inmune adaptativa. Los neutrófilos actúan en la fase temprana de la infección mediante la fagocitosis y la destrucción posterior de la bacteria, sin embargo su rol en la defensa del organismo se considera de baja eficiencia ya que la bacteria puede crecer y sobrevivir en su interior y diseminarse a diferentes órganos, desencadenando la infección persistente. Las células Natural Killer eliminan las células infectadas, estas actúan tras el estímulo por parte de *B. abortus* a las células presentadoras de antígeno para la producción de interleuquina 12 (IL-12) que a su vez estimula a las células NK a secretar IFN- γ . (Rivers y cols., 2006).

Inmunidad adaptativa. Se conoce que la exposición prolongada de un animal frente a *Brucella* modifica la respuesta inmune, desde una reacción inicial de inmunidad mediada por células hacia una respuesta humoral que se caracteriza por la producción inicial de IgM seguido de un aumento de IgG1, esta respuesta se relaciona con una disminución en la actividad de las células T tipo 1, por lo tanto baja la producción de INF- γ , favoreciendo de esta forma el incremento de la actividad de las células T de tipo 2. Consecuentemente, la respuesta inmune mediada por células disminuye y se establece la infección crónica, esta última se evidencia por la síntesis prolongada de IgG y niveles bajos de IgM (Oñate y cols., 2000; Ron Roman, 2003; Rivers y cols., 2006).

Las funciones de la respuesta inmune adaptativa en la brucelosis se basan principalmente en tres mecanismos. Primero, la producción de IFN- γ por células T CD4+, CD8+, y células T $\gamma\delta$, que activa la función bactericida en macrófagos. Segundo, la citotoxicidad de células T CD8+ y células T $\gamma\delta$ que eliminan macrófagos

infectados. Y tercero, isotipos de anticuerpos Th1, tales como IgG2a que opsonizan al patógeno para facilitar su fagocitosis (Ko y Splitter, 2003; Rivers y cols., 2006).

Formas y manifestaciones clínicas.

Las lesiones macroscópicas en el ganado no son patognomónicas. Las lesiones comunes de los tejidos maternos incluyen placentitis necrótica y mastitis intersticial; las vacas gestantes presentan una linfadenopatía en el sitio de la infección que desencadenará en una linfadenitis aguda (Carvalho y cols., 2010; Olsen y Tatum, 2010). En el útero de las vacas infectadas se observa hemorragias multifocales y exudado necrótico fibrinoso, fétido, de coloración amarilla a pardo (Carvalho y cols., 2010; Poester, Samartino y Santos, 2013). Los placentomas se presentan normales o con necrosis y hemorragias severas, además se observa engrosamiento de las áreas intercotiledonarias. En los animales con lesiones placentarias menos severas es poco probable que se presente el aborto, sin embargo los terneros recién nacidos son débiles y mueren (Carvalho y cols., 2010; Olsen y Tatum, 2010).

Las lesiones microscópicas tampoco son patognomónicas pero son más específicas. Las células trofoblásticas, células diana primarias de la placenta, se hinchan y se llenan con cocobacilos, se observa un infiltrado inflamatorio con presencia de neutrófilos e histiocitos asociado con edema y necrosis. El endometrio tiene una infiltración severa de neutrófilos, linfocitos, células plasmáticas y unos pocos eosinófilos. La inflamación se asocia con un gran número de células de *B. abortus* dentro de los macrófagos y trofoblastos, determinando erosiones multifocales o ulceraciones superficiales del epitelio luminal (Carvalho y cols., 2010; Poester y cols., 2013). En la glándula mamaria se desarrolla una mastitis intersticial multifocal con acumulación intersticial de macrófagos e infiltración de neutrófilos entre los acinos glandulares (Carvalho y cols., 2010).

En el feto las lesiones incluyen pleuritis fibrinosa, bronconeumonía, necrosis y granulomas en el pulmón y otros tejidos, peritonitis, esplenitis. La bronconeumonía es la lesión más frecuente y la pericarditis fibrinosa se ha

descrito como una lesión significativa en la brucelosis. Se observa también agrandamiento de los ganglios linfáticos internos ilíacos, bronquiales y hepático, así como en las glándulas suprarrenales e hipotrofia del timo (Carvalho y cols., 2010; Olsen y Tatum, 2010; Poester y cols., 2013).

1.5. Diagnóstico.

Diagnóstico bacteriológico.

El aislamiento y la identificación de la bacteria es la prueba de diagnóstico más confiable, sin embargo su uso se restringe de ser una práctica habitual por el alto costo en su implementación, el riesgo de manipulación que exige niveles de bioseguridad altos (laboratorios de bioseguridad tres) además de ser considerada un agente potencial para el bioterrorismo. Para el aislamiento de *Brucella* se toman muestras de placenta, leche y, del pulmón y estómago del feto; estas muestras requieren de un manejo adecuado para evitar contaminaciones que determinen falsos negativos (Ron Roman, 2003; Dirección de Epidemiología, 2013; Figueiredo y cols., 2015)

Diagnóstico serológico.

Las pruebas serológicas se basan en la respuesta humoral que induce la cadena O del PLS de *B. abortus* a través de la producción inicial de IgM seguida de IgG1 e IgG2/IgA; estas últimas se producen en bajas concentraciones y posteriormente en el curso de la infección, se reconoce a IgG1 como el blanco principal en los ensayos serológicos. Las pruebas de diagnóstico serológico son las más utilizadas por su rapidez, alta sensibilidad y especificidad y bajo costo (Carvalho y cols., 2010; Ali y cols., 2017).

Rosa de Bengala (RB). Esta prueba es una de las más utilizadas por su rapidez y sensibilidad. Se basa en la aglutinación del antígeno en suspensión en presencia del anticuerpo de la muestra. Se utiliza células completas de *B. abortus* cepa 99 inactivadas y coloreadas con rosa de bengala a un pH de 3,65. Es una

prueba capaz de detectar anticuerpos de tipo IgM e IgG, aunque el pH ácido previene alguna aglutinación por IgM y estimula la aglutinación por IgG1, reduciendo así alteraciones no específicas. Esta prueba se la utiliza como prueba de despistaje inicial o screening, por lo que requiere confirmación con otras pruebas (AGROCALIDAD, 2009; World Organization for Animal Health, 2016; Ali y cols., 2017).

Prueba de antígeno buferado en placa. Conocida como BPAT (por sus siglas en inglés Buffered Plate Agglutination Test) es una prueba similar a la aglutinación en placa de Rosa de Bengala. El antígeno utilizado es a partir de *B. abortus* cepa 1119-3. Esta prueba al igual que Rosa de Bengala son las más utilizadas y fiables para la identificación de rebaños infectados; son pruebas muy sensibles, especialmente para la detección de anticuerpos inducidos por la vacuna y las muestras positivas deben confirmarse con pruebas complementarias (Seleem y cols., 2010; World Organization for Animal Health, 2016).

Prueba de aglutinación en tubo - SAT (Serum Agglutination Test). Es una prueba de aglutinación que utiliza una suspensión bacteriana de la cepa 99 o de la cepa 1119-3 de *B. abortus* en solución salina de fenol. Su especificidad mejora significativamente con la adición de EDTA al antígeno reduciendo el nivel de falsos positivos. La prueba se realiza en tubos o en microplacas. Se preparan al menos tres diluciones de cada suero sospechoso y se mezcla con el antígeno para su posterior incubación. Se utiliza generalmente para detectar infecciones agudas. Entre las desventajas se menciona las reacciones cruzadas con otras bacterias, la vacunación y falsos negativos en infecciones crónicas (Ron Roman, 2003; World Organization for Animal Health, 2016).

Prueba de Fijación de Complemento -CFT (Complement Fixation Test). Detecta anticuerpos IgG fijadores del complemento. Existen numerosas variaciones de la prueba sin embargo el antígeno que se utiliza es a partir de una cepa de *B. abortus* que puede ser S99 O S1119-3. Esta prueba es ampliamente utilizada a pesar de la complejidad en su desarrollo, requiere de instalaciones adecuadas en los laboratorios y personal capacitado para titular y mantener los reactivos con

precisión. Se utiliza en muchos países como una prueba confirmatoria por su mayor especificidad, sin embargo puede dar lugar a reacciones positivas en bovinos vacunados con *B. abortus* S19 (World Organization for Animal Health, 2016; Ali y cols., 2017).

Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas. ELISA por su acrónimo en inglés Enzyme linked immunosorbent assay. Esta técnica en general se basa en un antígeno inmovilizado que se combina con el correspondiente anticuerpo si está presente en el suero y que está ligado a una enzima capaz de generar un producto detectable.

ELISA Indirecto. (I-ELISA) Existen variaciones basadas en el uso de diferentes preparaciones de antígeno como células enteras, conjugados o LPS, estos últimos son altamente sensibles para la detección de anticuerpos anti-*Brucella* en bovinos, sin embargo no diferencia a los anticuerpos producidos por la vacunación con cepa 19. Las cepas recomendadas para la producción de antígenos son *B. abortus* 99 y 1119-3. Las pruebas que utilizan LPS como antígeno son proporcionadas por diferentes casas comerciales y han sido validados en extensos ensayos de campo, estas pruebas se realizan tanto en suero como en leche. Al igual que ELISA competitivo son utilizadas como pruebas de confirmación. (Carvalho y cols., 2010; Poester y cols., 2013; World Organization for Animal Health, 2016)

ELISA Competitivo. (C-ELISA) este ensayo tiene una especificidad mayor si se compara con la prueba de fijación de complemento y una sensibilidad mayor a Rosa de Bengala. Para su aplicación se requiere de equipos especializados y de personal capacitado para una correcta interpretación de resultados. Para el desarrollo de esta prueba se utiliza un anticuerpo monoclonal que unido a la muestra a analizar se incuba con el LPS purificado de *B. abortus* que se encuentra adherido a la placa o pocillo. El uso combinado de pruebas como ELISA competitivo o Elisa indirecto y Rosa de Bengala para el diagnóstico de brucelosis bovina se justifica por su alta sensibilidad y especificidad, la reducción de costos operativos en el laboratorio y para el productor así como el análisis de una gran

cantidad de muestras (AGROCALIDAD, 2009; World Organization for Animal Health, 2016; Ali y cols., 2017).

Prueba del anillo en leche o Ring test (MRT). Se basa en la reacción de IgA e IgM tras la incubación de la muestra de leche con el antígeno coloreado con hematoxilina y que se manifiesta por la formación de un anillo de color azul. Las reacciones falsas positivas pueden ocurrir en bovinos vacunados en menos de 4 meses antes de la prueba, muestras que contienen leche anormal como el calostro o en casos de mastitis (Ron Roman, 2003; World Organization for Animal Health, 2016).

Una alternativa para el diagnóstico definitivo de brucelosis bovina, es el uso de técnicas como *PCR* para detectar ADN de *Brucella*, sin embargo una de las desventajas más gries radica en los altos casos para su aplicabilidad como prueba de rutina (Carvalho y cols., 2010).

Prueba alérgica o Skin test. Esta prueba se realiza mediante la aplicación intradérmica de brucelina, extracto citoplasmático de *Brucella* libre de LPS, en el pliegue caudal de la cola, la piel del flanco o del lado del cuello. La ausencia de LPS evita reacciones inflamatorias inespecíficas o interferencia en pruebas serológicas que se realicen posteriormente por la probable producción de anticuerpos por parte del huésped que pueda generar la aplicación del antígeno. Esta prueba tiene una alta sensibilidad y adecuada sensibilidad y se recomienda para el tamizaje o screening de rebaños no vacunados (Ron Roman, 2003; World Organization for Animal Health, 2016).

1.6 Lucha.

Las infecciones por *Brucella* además de constituir un grave problema en la salud pública, tiene un impacto económico importante especialmente en países en desarrollo debido a las pérdidas ocasionadas por el aborto de los animales gestantes, reducción de la producción de leche y la infertilidad que causa (Seleem, y cols., 2010).

El control de la brucelosis animal en los países en desarrollo requiere un esfuerzo considerable para construir y aplicar un programa que considere la capacitación y concienciación a productores y consumidores sobre los riesgos de la brucelosis; acceso a instalaciones de laboratorio adecuadas y personal capacitado para recolección y análisis de muestras; acciones de control y de vigilancia activa. Se ha confirmado que la reducción de la incidencia de brucelosis en los reservorios disminuye la incidencia de la enfermedad en los humanos (Seleem y cols., 2010).

Los programas de erradicación exitosos siempre han sido costosos, largos y difíciles de llevar a cabo. Las dificultades en el control y la erradicación de la brucelosis abarcan una serie de factores, uno de ellos y posiblemente el más importante está relacionado a las condiciones de manejo de los animales: cría extensiva, trashumancia, deficientes prácticas sanitarias, coexistencia de varias especies de ganado entre otras (Godfroid y cols., 2011). En regiones con alta prevalencia de brucelosis, las acciones prioritarias para el control y erradicación se basan en la vacunación de los animales susceptibles y en la eliminación de animales infectados (Briones y cols., 2001; Seleem y cols., 2010).

Tratamiento.

Debido a que la localización de *Brucella* es intracelular, para su tratamiento se requiere la asociación de más de un antimicrobiano por varias semanas; se puede utilizar Tetraciclina (Oxitetraciclina) y un aminoglicósido (gentamicina), sin embargo esta práctica no es recomendada; el control y erradicación de la enfermedad requiere de la eliminación de los animales reactores positivos ya que son los que mantienen la enfermedad en un predio.

Vacunación.

La prevención de la diseminación de la brucelosis se basa en la administración de vacunas adecuadas contra la infección por *B. abortus* (Rivers y cols., 2006). Se considera que una vacuna debe cumplir con ciertas características

que aunque son evidentes tras el uso de las vacunas clásicas durante más de medio siglo, deben provocar una inmunidad sólida y duradera, ser inocuas independientemente del estado fisiológico del animal, eficaz en una dosis única, no interferir con las pruebas de diagnóstico serológico, no ser virulenta para los humanos, ser estable y asequible (Godfroid y cols., 2011). Con este objetivo se han utilizado clásicamente cepas bacterianas atenuadas y componentes antigénicos propios de *Brucella*. La habilidad de un antígeno específico para inducir en forma preferencial una respuesta Th1 es un aspecto importante a considerar en el desarrollo de vacunas contra *Brucella abortus* (Rivers y cols., 2006).

Las vacunas más utilizadas en las últimas décadas contra brucelosis bovina son *B. abortus* cepa 19 y cepa RB51 (Dorneles, Sriranganathan y Lage, 2015) que son vacunas de cepas atenuadas al igual que la cepa 45/20. Existen además vacunas subcelulares en base a antígenos que forman parte de la estructura de la bacteria y vacunas basadas en moléculas de ácidos nucleicos, como las vacunas ADN y las vacunas ARN (Rivers y cols., 2006).

La cepa 19 de *Brucella abortus* es una cepa lisa que posee la cadena O del LPS. Fue aislada en el año 1923 por el Dr John Buck de leche de una vaca Jersey. En los animales inmunizados con esta cepa se pueden observar anticuerpos específicos del tipo IgG1, IgG2b e IgM (Rivers y cols., 2006; Dorneles y cols., 2015). Esta fue la primera vacuna que se utilizó extensivamente para el control de la brucelosis bovina. El uso de esta vacuna conduce a la producción de anticuerpos cuya persistencia depende principalmente de la edad de los animales durante la vacunación (Seleem, Boyle y Sriranganathan, 2010). La vacunación se realiza a las hembras entre tres y seis meses de edad (World Organization for Animal Health, 2016).

La cepa 45/20 es una cepa rugosa; a pesar de que no induce anticuerpos contra la cadena O del LPS induce una protección significativa contra la infección por *Brucella abortus*; no es muy utilizada porque es inestable y puede revertir a su forma virulenta *in vivo* (Corbel, 1997; Rivers y cols., 2006).

Brucella abortus RB51 es una cepa rugosa, la protección que proporciona la vacunación con esta cepa se debe a la activación de linfocitos T y a la inducción de altos niveles de IFN- γ , fundamental en las etapas primarias de la infección (Pasquali y cols., 2001; Rivers y cols., 2006). Esta vacuna se aplica en varios países con diferentes protocolos con respecto a la edad y al número de dosis. En Estados Unidos se aplica a animales de cuatro a 12 meses de edad, en otros países se recomienda inclusive una revacunación a partir de los 12 meses de edad (Rivers y cols., 2006; World Organization for Animal Health, 2016).

Con respecto a las vacunas que utilizan componentes antigénicos, conocidas como vacunas subcelulares, se han probado distintos antígenos de *Brucella* para inducir una respuesta inmune mediada por células. Estos antígenos forman parte de la estructura de la bacteria, entre ellas una lipoproteína presente en la superficie de la bacteria, la proteína periplásmica P39 y la proteína bacterioferritina. En los últimos años han surgido dos nuevas estrategias de inmunización altamente efectivas, basadas en la vacunación con moléculas de ácidos nucleicos, las vacunas ADN y las ARN se constituyen actualmente en vacunas de tercera generación (Rivers y cols., 2006).

Erradicación.

Desde principios del siglo XX muchos países adoptaron medidas dirigidas al control y erradicación de la brucelosis en diferentes poblaciones animales con el objetivo de disminuir las pérdidas en la producción y principalmente el riesgo para la salud humana (Poester y cols., 2009; de Alencar Mota y cols., 2016).

Los países que han erradicado la brucelosis bovina son Alemania, Austria, Bélgica, Bulgaria, Checoslovaquia, Dinamarca, Finlandia, Hungría, Noruega y Países Bajos. Se consideran libres la mayoría de los países europeos, Australia, Canadá, Estados Unidos Gran Bretaña y Nueva Zelanda. En América Latina Argentina, Brasil tienen programas de control limitados (Acha y Szyfres, 2001) En la actualidad Uruguay tiene un plan de control avanzado. Paraguay a pesar de haber implementado un programa de control y erradicación en el año 1979 aún no ha

logrado erradicar la enfermedad (Aznar y cols., 2014). Ecuador inició con un plan de control en el año 2009 (AGROCALIDAD, 2009).

En general la estrategia técnica en la que se debe basar un programa de erradicación de la brucelosis bovina comprende tres líneas de acción las cuales deberán complementarse y adaptarse a las características propias de cada país: 1) detección de rebaños infectados, 2) limpieza de los rebaños infectados 3) prevención de la diseminación *de B abortus*. A estas líneas estratégicas se unen la participación de personal técnico y laboratorios acreditados, certificación de rebaños libres de brucelosis, vacunación de hembras, diagnóstico de laboratorio, sistema de información eficiente y la normativa correspondiente (Rivera y cols., 2002).

En Ecuador, el Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina propuesto por la Autoridad Sanitaria Nacional (AGROCALIDAD) en el año 2009, tiene como objetivo general disminuir la prevalencia de brucelosis bovina en el territorio nacional y certificar predios libres de brucelosis. Para su ejecución estableció estrategias de prevención y control a nivel nacional y regional.

La estrategia nacional comprende los siguientes aspectos:

- Vacunación con Cepa 19 a terneras de 3-6 meses, una sola vez.
- Vigilancia epidemiológica a través del diagnóstico con pruebas de Ring-Test en leche, aglutinación en suero sanguíneo (Rosa de Bengala) y ELISA Competitivo (c-ELISA) como prueba confirmatoria.
- Eliminación de animales positivos
- Para la compra de animales de reemplazo se requiere que los animales estén vacunados y presenten resultados negativos a las pruebas serológicas.

Las estrategias para cada región epidemiológica son las siguientes:

- Regiones de alta prevalencia (1 y 2)

Campañas sistemáticas de vacunación, acciones de vigilancia epidemiológica, identificación y certificación de fincas libres, sacrificio de animales positivos, control sanitario de ingreso y egreso de animales, y actividades de educación sanitaria

- Regiones de baja prevalencia (3 y 4)

Vigilancia epidemiológica dirigida a la identificación y establecimiento de zonas libres de la enfermedad, vacunación, sacrificio de animales positivos, control en la movilización de los animales y educación sanitaria.

- Región indemne (5)

Encuesta sero-epidemiológica en las Islas Galápagos, de acuerdo a la normativa establecida por la OIE para determinar zonas libres.

En el cuadro 2 se resume las actividades que comprende la estrategia nacional.

Cuadro 2. Estrategias para el control de brucelosis bovina a nivel nacional

Regiones	Provincia	Objetivos	Diagnóstico	Identificación y eliminación	Vacunación	Educación sanitaria
Región 1 Sierra Norte	Carchi Imbabura Pichincha Cotopaxi Tungurahua Chimborazo	Reducir la prevalencia A. Alta-Moderada B. Moderada-Baja C. Baja-Libre	Pruebas de tamizaje Ring test Rosa de Bengala ELISA	Identificación y eliminación de animales positivos Certificación de fincas libres	Masiva de terneras de 3-6 meses	Promoción del proyecto
Región 2 Costa	Guayas Los Ríos El Oro Manabí Esmeraldas			Identificación y eliminación de animales positivos Certificación de fincas libres	Masiva de terneras de 3-6 meses	Capacitación de productores profesionales y auxiliares Producción y distribución de material divulgativo, videos, afiches plegables
Región 3 Sierra Sur	Bolívar Cañar Azuay Loja	Reducir la prevalencia B. Moderada-Baja C. Baja-Libre		Certificación de fincas libres	Masiva de terneras de 3-6 meses	
Región 4 Amazonía	Sucumbíos Napo Orellana Pastaza Morona S. Zamora Ch.	Estudio de prevalencia	Encuesta Sero-epidemiológica		Masiva de terneras de 3-6 meses	Cuñas radiales
Región 5 Galápagos	Galápagos	Mantener condición epidemiológica libre	Encuesta Sero-epidemiológica			

Fuente. AGROCALIDAD 2009

De la experiencia de los procesos y esfuerzos realizados en los países que se ha erradicado la brucelosis bovina, se observó una clara disminución de los casos de brucelosis humana. Los resultados de la aplicación de las diferentes acciones que conforman un programa de erradicación solo son efectivos cuando se evidencia la participación de las partes involucradas: ganaderos, productores, industria lechera y organismos estatales que generen políticas estatales acordes a la situación de cada país (Seleem y cols., 2010).

2. *Coxiella burnetii*.

El agente causal de la fiebre Q es *Coxiella burnetii*, un organismo intracelular obligado, no móvil, que completa su ciclo de vida dentro de los fagosomas de las células infectadas. El organismo había sido clasificado dentro de la familia Rickettsiaceae porque sus miembros no son cultivables en medios axénicos, han sido aislados en garrapatas, son pequeños e intracelulares estrictos; sin embargo, difiere significativamente en su fisiología y composición de los otros microorganismos del orden que causan tifus, fiebres tipo manchada (spotted fever) o pustular en el hombre. La más reciente clasificación basada en estudios filogenéticos del ARN ribosomal 16S coloca a este microorganismo en el phylum de las Proteobacterias, clase de las Gammaproteobacterias, orden Legionella y familia Coxiellaceae (Arricau y Rodolakis, 2005).

La fiebre Q fue descrita por primera vez por el Dr. Edward Derrick en 1937, después de una denuncia en agosto de 1935 sobre una enfermedad febril en trabajadores de mataderos en Queensly, Australia. Al intentar relacionar la fiebre con la ocupación dentro del matadero, Derrick encontró que los trabajadores afectados ejercían tareas disímiles (matarifes, desolladores, cocineros) por lo que no pudo encontrar una correlación directa entre ambos hechos (Derrick, 1944). Debido al desconocimiento de la etiología de la enfermedad, la denominó fiebre Q, en referencia a la primera letra del inglés “query” (pregunta). Derrick inoculó cobayos con la orina o la sangre de los pacientes y aunque pudo transmitir

exitosamente la infección de un cobayo a otro, no aisló el agente infeccioso; envió los bazos de estos animales a Frank Mcfarlane Burnet del Instituto Walter y Elisa Hall en Melbourne, quien en ese entonces manejaba muy bien los modelos múridos y de corioalantoides aviar en la determinación de agentes infecciosos. En conjunto con Mavis Freeman, aislaron el organismo que “parecía una rickettsia” en ratones adultos. Derrick, agradecido, denominó a este organismo *Rickettsia burnetii* en honor a su descubridor (Mackerras, 1979). En Estados Unidos, durante el mismo período, Herald Cox y Gordon Davis, del laboratorio de las Montañas Rocosas, descubrieron la misma bacteria en garrapatas. Davis encontró que los cobayos infectados con garrapatas desarrollaban una enfermedad similar a la fiebre de las Montañas Rocosas, causada por *Rickettsia rickettsii*. En mayo de 1938, Rolla Dyer, director del Instituto Nacional de Salud, visitó el laboratorio de Cox y dieciséis días más tarde desarrolló una enfermedad con dolor retrorbital y fiebre. Su suero fue inoculado en cobayos y éstos enfermaron, lo que constituyó la primera demostración de infección accidental en laboratorio por la fiebre Q (Boarbi, Fretin y Mori, 2016). Pronto se descubrió que los microorganismos de Estados Unidos y Australia eran el mismo patógeno y en honor a sus descubridores se le denominó *Coxiella burnetii* (Marrie, 1990)

2.1. Etiología.

Aunque *Coxiella* fue históricamente considerada como una *Rickettsia*, el análisis de la secuencia genética permitió clasificar al género *Coxiella* en el orden *Legionellale*, familia *Coxiellaceae* (Arricau y Rodolakis, 2005). Este género tiene una sola especie, *C. burnetii* (Fournier y cols., 1998).

C. burnetii es una bacteria Gram-negativa e intracelular obligada, tiene forma de bacilo, no capsulado, pleomórfica, inmóvil, su tamaño es de 0,4-1 x 0,2-0,4 μm . Para su desarrollo depende de células eucarióticas en las que se aloja con preferencia en los fagolisosomas de las células huésped, principalmente macrófagos (Maurin y Raoult, 1999; Acha y Szyfres, 2001; Waag, 2007). Posee actividad superóxido - dismutasa, ácido fosfatasa y catalasa, enzimas que le permiten evadir la actividad inmune del hospedador.

C. burnetii presenta una variación de fase antigénica relacionada con una diferenciación en el lipopolisacárido (LPS), este es el único factor de virulencia genéticamente confirmado del patógeno y responsable de la variación de la fase antigénica, en el cuál la fase I es virulenta y la fase II es avirulenta (Fournier y cols., 1998; Waag, 2007). La transición de la fase I a II es resultado de la pérdida de azúcares en el núcleo del antígeno O del LPS; algunas veces la transición de fase I a fase II se asocia con una gran deleción cromosómica en la cual se eliminan un importante número de genes que participan en la biosíntesis del LPS (Contreras y cols., 2013).

El ciclo de desarrollo de *C. burnetii* manifiesta morfotipos bacterianos o variantes: uno pequeño y compacto denominado variante celular pequeña (SCV por sus siglas en ingles de small cell variant), uno grye, metabólicamente activo denominado variante celular grye (LCV por sus siglas en inglés large cell variant) (Angelakis y Raoult, 2010) y un tercero de células pequeñas y densas (SDC). La variante celular pequeña es responsable de la alta infectividad del organismo, así como de su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales relativamente extremas; como desecación, radiación UV, presión osmótica o resistencia a desinfectantes (Cutler y cols., 2007; Waag, 2007). Por el contrario, la variante celular grande es únicamente intracelular e interviene en la replicación y persistencia dentro de los fagolisosomas acidificados de monocitos y macrófagos (Cutler y cols., 2007; Waag, 2007; Angelakis y Raoult, 2010; Contreras y cols., 2013). La transición entre SCV y LCV no implica una variación de fase con referencia a la estructura del LPS, pero puede ir acompañada de cambios en la expresión de proteínas de superficie (Waag, 2007). Las variantes SDC y SDV representan las formas de la bacteria con mayores posibilidades para sobrevivir extracelularmente como partículas infecciosas (Arricau y Rodolakis, 2005; OIE, 2015).

2.2. Fiebre Q en humanos.

Considerada un problema para la salud pública y animal, esta enfermedad se reporta y es reconocida como endémica en todo el mundo (Guatteo y cols., 2011) a excepción de Nueva Zelanda (Cutler y cols., 2007). La seroprevalencia de la infección por *C. burnetii* en humanos oscila entre menos de 1% en Canadá (Messier y cols., 2012) y 52,7% en Chipre (Psaroulaki y cols., 2006). El mayor brote de Fiebre Q en humanos se produjo en los Países Bajos con 2357 pacientes notificados en el año 2009 (van der Hoek y cols., 2010). En América Latina existen pocos reportes sobre la situación de *C. burnetii* con prevalencias que van desde el 1% - 15% en Perú (Blair y cols., 2004) hasta el 60% en Uruguay (van den Brom y cols., 2013); Brasil reporta una prevalencia de 3,9% (Costa y cols., 2005), Colombia y Guyana Francesa 23,6% (Mattar y Parra, 2006; Epelboin y cols., 2012; Contreras y cols., 2013). En Ecuador el único estudio realizado reportó el 4,9 % de pacientes febriles positivos a *C. burnetii* (Manock y cols., 2009).

Los animales de granja como bovinos, cabras y ovejas se determinan comúnmente como fuentes de infección. La literatura refiere inclusive a gatos, conejos y perros como fuentes potenciales de brotes urbanos (Angelakis y Raoult, 2010). El espectro de huéspedes reservorios incluye animales silvestres e incluso especies no mamíferas entre los que se cita a reptiles, peces, aves y garrapatas (Cutler y cols., 2007; López-Gatius y cols. 2012). Entre los grupos de riesgo se considera a la Fiebre Q como una zoonosis profesional con un incremento de infección en veterinarios, ganaderos, inseminadores, trabajadores de mataderos o de laboratorios (Maurin y Raoult, 1999; EFSA, European Food Safety Authority, y ECDC y cols., 2012). Las personas en contacto con animales de granja se infectan generalmente por la inhalación de aerosoles contaminados por productos del parto o de abortos, líquido amniótico, placenta o lana (Fournier y cols., 1998; Cutler y cols., 2007; Fenollar y Raoult, 2007) inclusive la bacteria se excreta en la orina, heces y leche de los animales infectados (Arricau y Rodolakis, 2005; Cutler y cols., 2007); existe además el riesgo para el personal de los laboratorios que trabaja en contacto con animales infectados (Fournier y cols., 1998). La transmisión por la ingestión de productos lácteos contaminados aunque se

considera en menor riesgo se describe también en algunos reportes, así como la posibilidad de transmisión vertical y sexual (Angelakis y Raoult, 2010; Guatteo y cols., 2011).

La presentación clínica de fiebre Q varía ampliamente; el 60% de las infecciones permanecen asintomáticas seguidas por seroconversión (Hogema y cols., 2012; Contreras y cols., 2013). Un título de inmunoglobulina (Ig) G alto y persistente es indicativo de infección crónica, mientras que la IgG de fase 2 se detecta después de una infección aguda (Hogema y cols., 2012). La ruta de la infección puede determinar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Waag, 2007). En la fase aguda de la enfermedad las manifestaciones clínicas más comunes son: fiebre, neumonía y hepatitis (Raoult y cols., 2000; Fenollar y Raoult, 2007; Guatteo y cols., 2011) y se pueden presentar después de un periodo de incubación de aproximadamente tres semanas (Hogema y cols., 2012); en algunas ocasiones se observa erupciones cutáneas y síntomas neurológicos (Angelakis y Raoult, 2010). Aunque con frecuencia la enfermedad no se diagnostica, la mayoría de los pacientes se recupera, particularmente aquellos que reciben en fases tempranas el tratamiento antibiótico (Manock y cols., 2009). El 2% de los casos de fiebre Q aguda es fatal (EFSA, European Food Safety Authority, y ECDC y cols., 2012). La fiebre Q crónica se puede desarrollar meses o años después de la infección inicial, algunas veces asintomática o con daños severos que conduce generalmente a una endocarditis en el 75% de los casos (Gami y cols., 2004; Fenollar y Raoult, 2007), hepatitis crónica, osteoartritis, abortos y muerte fetal en mujeres embarazadas. La fase crónica se asocia con pacientes inmunodeprimidos o en pacientes con daño vascular después de un episodio de fiebre Q aguda. La fiebre Q crónica puede ser fatal en el 1 al 11% de los pacientes (Fournier y cols., 1998).

Las mejores pruebas diagnósticas son aquellas que permiten la identificación directa de la bacteria. Estas pruebas incluyen cultivos celulares, PCR y la inmunodetección con muestras de biopsia de tejido, sin embargo estas técnicas requieren un laboratorio de bioseguridad de nivel tres y personal entrenado debido a la infectividad extrema de *C. burnetii*. Para el diagnóstico específico indirecto, la técnica a utilizar debe ser muy sensible; aunque se han descrito

muchas técnicas como Fijación del complemento, ELISA o microaglutinación, el método de referencia es el ensayo de inmunofluorescencia (Fournie y cols., 1998).

2.3. Aspectos epidemiológicos de Fiebre Q en bovinos.

Fiebre Q es un problema de salud animal. Aunque las infecciones por *C. burnetii* en los bovinos son generalmente asintomáticas causa desordenes reproductivos. Abortos, muerte fetal y de neonatos, nacimiento de terneros débiles, metritis e infertilidad son los signos clínicos más frecuentes y que causan además un grave impacto económico en la ganadería (Arricau y Rodolakis, 2005). En la mayoría de los casos el aborto ocurre al final de la gestación sin signos clínicos específicos hasta que el aborto es inminente como ocurre con la brucelosis o clamidiosis. En los bovinos la metritis es la manifestación más frecuente de la enfermedad; las hembras se recuperan rápidamente después del aborto y generalmente no abortan en las siguientes gestaciones, sin embargo la metritis puede persistir durante varios meses (Arricau y Rodolakis, 2005). Los animales infectados eliminan las bacterias a través de los restos de abortos o de partos en los fluidos del nacimiento y en la placenta, así como a través de secreciones vaginales, leche, heces, orina y semen (Guatteo y cols., 2006, 2011; Natale y cols., 2009; Ruiz-Fons y cols., 2010; Astobiza y cols., 2011). Más del 10⁹ de bacterias por gramo de placenta de los rumiantes domésticos pueden ser eliminados durante el nacimiento (Bewley, 2013); en la leche las bacterias se eliminan varios meses después del parto, inclusive durante varios periodos de ordeño (Arricau y Rodolakis, 2005; Rodolakis, 2009).

La infección por *C. burnetii* en bovinos se reporta en los cinco continentes. En África los estudios determinan prevalencias de 4,0% en Chad (Guatteo y cols., 2011), y 14,8% Togo (Dean y cols., 2013). En Asia los reportes de seroprevalencia citan a India con 14,7%, Irán 10,8%, Japón 60,4%, y Turquía 6,0%. En Europa, en el año 2010, se reportó prevalencias de 0,4% en Bulgaria a 29,0% en Dinamarca; así, se observa en Austria 2%, Bélgica 9,6%, España 11,6% y Polonia 0,6% (EFSA, European Food Safety Authority, y ECDC y cols., 2012). En Norte América, se

reportan prevalencias de 3,4 a 82% en Estados Unidos, 23,8% en Canadá y 28% en México (Guatteo y cols., 2011) En rebaños de Canadá y Estados Unidos el 67% y de 1 al 73% resultaron seropositivos a *C. burnetii* respectivamente (McCaughey y cols., 2010).

En América del Sur la presencia de *C. burnetii* en bovinos se describe únicamente en Colombia en un estudio realizado en el año 1977 con una prevalencia de 25% (Lorbacher de Ruiz, 1977). Chile y Venezuela reportan prevalencias de 14% y 60,63% en rebaños ovinos y caprinos respectivamente (González y Moreira, 2003; Oropeza y cols., 2010). En Ecuador, no existen estudios realizados en rumiantes, la infección por *C. burnetii* se reporta únicamente en humanos en un estudio realizado en pacientes febriles durante los años 2001 a 2004 (Manock y cols., 2009).

Hospedadores.

Los rumiantes domésticos como bovinos, cabras y ovinos son los principales reservorios de la bacteria, aunque también los animales silvestres y las garrapatas están implicados en el ciclo de *C. burnetii* en la naturaleza (Angelakis y Raoult, 2010) Se conoce que cerca de 40 especies de garrapatas pueden estar naturalmente infectadas con *C. burnetii* lo cual se constituye en un factor importante para mantener la infección en el medio aunque esta no forma parte de las fuentes de contagio en los humanos (Maurin y Raoult, 1999; Angelakis y Raoult, 2010). En las garrapatas, *C. burnetii* puede multiplicarse en los intestinos, estómago, ser excretada en las heces y ser transmitida transováricamente (Woldehiwet, 2004; Arricau y Rodolakis, 2005; Contreras y cols., 2013).

Se ha propuesto que *C. burnetii* se mantiene en la naturaleza a través de dos ciclos diferentes. Un ciclo silvestre en el que se vincula a las garrapatas y los animales silvestres y el ciclo doméstico en el que los rumiantes y otras especies animales como los perros y gatos son los principales reservorios. El vínculo propuesto entre los dos ciclos es poco conocido, en especial porque el ciclo

doméstico ha sido la principal fuente de infección humana y en ese sentido se han orientado la mayor parte de los estudios realizados (Ruiz-Fons y cols., 2010).

Factores de riesgo relacionados con el hospedador.

Varios estudios han demostrado que el riesgo de infección por *C. burnetii* en los rumiantes varía con los rasgos de cada animal, tales como la edad, el estado de gestación, la raza, el sexo, el nivel de producción de leche y la etapa de lactancia (McCaughey y cols., 2010; Garcia-Ispierto, Almería y López-Gatius, 2011; Paul y cols., 2012). Estudios realizados por McCaughey y cols., (2010) y Paul y cols., (2012) reportan el mayor riesgo de infección en vacas de raza Holstein frente a vacas de raza Jersey, la explicación a esta susceptibilidad se presume se debe a una posible variación genotípica entre las razas.

Existen varias descripciones de vacas infectadas multíparas seronegativas que no presentan una respuesta humoral contra *C. burnetii* (Guatteo y cols., 2006; Garcia-Ispierto, Almería y López-Gatius, 2011; Hansen y cols., 2011). Esta falta de respuesta es probablemente atribuible a la resistencia genética a la infección o a la inmunotolerancia de estos animales (Tutusaus y cols., 2015).

Factores de riesgo relacionados con el manejo y medio ambiente.

La estación se ha relacionado con la prevalencia de *C. burnetii*, posiblemente por la mayor presencia de garrapatas durante las estaciones cálidas (Cabassi y cols., 2006). Factores como el tamaño del rebaño, el pastoreo, las instalaciones también se relacionan con la infección de *C. burnetii* a los bovinos. (McCaughey y cols., 2010; Ruiz-Fons y cols., 2010; Paul y cols., 2012).

En varios estudios se reporta que el sistema de manejo puede influir en el ciclo de vida de *C. burnetii*, sistemas semi extensivos o extensivos si bien pueden disminuir el contacto entre los animales del rebaño; aumenta el riesgo de contacto entre el ganado y la fauna silvestre, que puede desempeñar un rol importante como reservorio de *C. burnetti* para el ganado (Ruiz-Fons y cols., 2010).

Factores de riesgo relacionados con el agente.

Las variantes de *C. burnetii* SCV y SDC se consideran probablemente como las formas persistentes en el huésped y ciertamente son las formas resistentes de *C. burnetii* en el ambiente. De hecho, se ha descrito una gran resistencia a la radiación UV, el calor, la desecación, la sonicación, el estrés osmótico y oxidativo. Esta resistencia permite que las bacterias sobrevivan extracelularmente como partículas infecciosas durante al menos 150 días; este rasgo específico de la resistencia de *C. burnetii* puede explicar su amplia difusión en el medio ambiente y su capacidad de infectar animales y seres humanos durante un largo período después de haber sido excretados por un primer huésped (Arricau y Rodolakis, 2005; Waag, 2007).

La diversidad genética y la virulencia de *C. burnetii* también están relacionadas con la expresión de moléculas del lipopolisacárido (LPS). *C. burnetii* muestra variaciones antigénicas similares a la variación lisa-rugosa de las enterobacterias. Las bacterias de fase I se aíslan de fuentes naturales y su LPS de longitud completa (forma lisa) se define serológicamente como la fase I. Los organismos de fase II se consideran poco virulentos y el LPS contiene el lípido A y algunos azúcares centrales, pero no existen azúcares del antígeno O. Otros genes codifican la catalasa, la superóxido dismutasa y la fosfatasa ácida, tres enzimas que pueden permitir a *C. burnetii* evitar la actividad microbicida de los macrófagos (Ghigo y cols., 2009).

Es importante señalar que *C. burnetii* al igual que *B. abortus* está considerada como un agente potencial de bioterrorismo y clasificada en la "Categoría B" como agente biológico crítico; esta clasificación se debe a su baja dosis infectiva, resistencia ambiental y la ruta de transmisión por aerosoles (Vaidya y cols., 2010; Duron y cols., 2015; OIE, 2015).

Contagio

La principal vía de contagio de *C. burnetii* es la vía aerógena, la infección ocurre luego de la inhalación de aerosoles o polvos contaminados resultantes de placentas, fluidos corporales o heces de animales infectados. La bacteria se excreta en gres cantidades en la orina, heces y leche inclusive varios meses después del parto y del aborto (Arricau y Rodolakis, 2005) factor importante en la propagación de la bacteria en el ambiente y consecuentemente en la transmisión al hombre y a los animales.

Las garrapatas también transmiten la infección a los animales (Fournier, Marrie y Raoult, 1998) y probablemente son las más importantes para mantener el ciclo completo de *C. burnetii* en la naturaleza (Marrie, 1990). La bacteria se transmite entre los vertebrados salvajes, especialmente en roedores, lagomorfos y aves silvestres (Maurin y Raoult, 1999). En las células del intestino medio de la garrapata *C. burnetii* se multiplica y luego es excretada a través de las heces sobre la piel del huésped mientras la garrapata se alimenta (Marrie, 1990; Angelakis y Raoult, 2010).

Los terneros también pueden ser infectados a través de la leche de sus madres (Lorbacher de Ruiz, 1977; Waag, 2007), *C. burnetii* está presente en altas concentraciones en el útero y en la glándula mamaria de los animales infectados (Mazeri y cols., 2012). Se conoce que las vacas eliminan la bacteria en la leche hasta por 32 meses (Marrie, 1990).

2.4. Patología.

En los animales la fiebre Q es una enfermedad sistémica aguda, que puede convertirse en una enfermedad crónica y debilitante. Generalmente, al igual que en los humanos, la puerta de entrada de *C. burnetii* en los animales es la orofaringe. Las bacterias realizan una multiplicación primaria en los ganglios linfáticos regionales observándose una bacteriemia subsiguiente que dura de 5 a 7 días; posteriormente las bacterias se localizan en las glándulas mamarias y en la

placenta de los animales gestantes (Woldehiwet, 2004). En modelos animales, el bazo, el hígado y otros tejidos del sistema reticuloendotelial parecen ser más fuertemente infectados. Casos de fiebre Q crónica pueden surgir años después de la presentación inicial, los animales suelen permanecer infectados durante su vida útil, con derivación del microorganismo de origen en condiciones de inmunosupresión, como el parto (van Schaik y Samuel, 2012).

La virulencia y los mecanismos patogénicos de *C. burnetii* no están claramente definidos, pero generalmente se acepta que los LPS bacterianos son importantes en la patogénesis de la fiebre Q en el hombre y los animales (Woldehiwet, 2004).

Respuesta Inmune.

La respuesta celular como la humoral son importantes para combatir la infección por *C. burnetii*. La inmunidad mediada por células probablemente juega un papel crítico en la eliminación de los organismos mientras que los anticuerpos específicos acelerarían este proceso; existen además estudios que apoyan la noción de la importancia de la inmunidad humoral en el desarrollo de la resistencia adquirida a la infección por *C. burnetii* (Zhang y cols., 2007).

La respuesta celular activa a los monocitos y macrófagos mediante el Interferón- γ (IFN- γ) produciendo nitrógeno reactivo e intermediarios de oxígeno que promueven la muerte intracelular de *C. burnetii* (Waag, 2007). El IFN- γ afecta a la conversión del fagosoma que contiene *C. burnetii* en fase I y por tanto, no se puede llevar a cabo la replicación de la bacteria (Yoh y cols., 2007; García-Ispierto y cols., 2014). Las células Th1 son esenciales para la activación de los macrófagos y por tanto para eliminar la infección. Las citoquinas proinflamatorias como la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF) y la interleuquina 12 (IL-12), son secretadas por los macrófagos y son capaces de modular la respuesta celular (Norlyer, 2000). Como se observa, las células T y el IFN- γ representan los principales componentes del sistema inmune frente a la infección por *C. burnetii*. Con respecto al rol de las células B se cree que juegan también un papel importante

en la protección de los tejidos al regular los fenómenos de inflamación en la infección (Yoh y cols., 2007).

No está claro aún el tiempo exacto de la seroconversión o de la duración de los anticuerpos que persisten en las vacas. En las hembras gestantes se puede observar un patrón muy estable de anticuerpos de *C. burnetii* durante toda la gestación, junto con una disminución postparto en los anticuerpos séricos, probablemente debido a su derivación al calostro antes del parto; sin embargo, poco se conoce sobre los niveles de anticuerpos de *C. burnetii* en el recién nacido y sobre la seroprevalencia y seroconversión en vaquillas (García-Ispierto y cols., 2014).

Formas y manifestaciones clínicas.

Las únicas manifestaciones patológicas que se han asociado con la infección crónica por *C. burnetii* en animales son el aborto, menor peso al nacer e infertilidad en el ganado bovino (Maurin y Raoult, 1999).

En los animales durante la fase aguda, *Coxiella burnetii* puede encontrarse en sangre, pulmones, bazo e hígado, mientras que durante la fase crónica existe una diseminación persistente de la bacteria en las heces y orina. La mayoría de animales permanecen asintomáticos y no se reporta fiebre (Marrie, 1990; Maurin y Raoult, 1999; Angelakis y Raoult, 2010). A diferencia de los humanos, la infección en los animales no desarrolla endocarditis crónica (Maurin y Raoult, 1999). Como se describió previamente, la infección por fiebre Q, afecta principalmente el sistema reproductivo de la hembra (Waag, 2007). Las placentas infectadas presentan exudados y engrosamiento fibroso intracotiledonario; la metritis es con frecuencia una manifestación única de la enfermedad en el ganado (Arricau y Rodolakis, 2005; Waag, 2007). En la mayoría de los casos el aborto ocurre al final de la gestación sin signos clínicos específicos; sin embargo, pueden nacer animales de bajo peso (Cabassi y cols., 2006; Angelakis y Raoult, 2010). Los fetos abortados se reportan normales o con lesiones poco específicas aunque en ocasiones se han

observado lesiones de neumonía; las tasas de aborto pueden variar de 3 a 80% (Marrie, 2007; Angelakis y Raoult, 2010).

En rumiantes previamente infectados la gestación se muestra como un momento crítico, la infección se reactiva y se excretan numerosas bacterias conjuntamente con la placenta y líquidos amnióticos tanto para casos de aborto como para partos normales (Woldehiwet, 2004). Así, el desprendimiento de *C. burnetii* en el medio ambiente ocurre durante el parto. Los productos de nacimiento, principalmente la placenta, están fuertemente contaminados con *C. burnetii* (Maurin y Raoult, 1999).

2.5. Diagnóstico.

Los métodos más frecuentes para la detección de *C. burnetii* son el aislamiento del virus, cultivo de bacterias, pruebas de microscopía electrónica, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, enzimoimmunoensayo de detección de antígeno, hibridación del ácido nucleico (NAH), y la amplificación del ácido nucleico, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El método rutinario para el diagnóstico de fiebre Q tras el aborto de los bovinos es la detección de la bacteria en frotis o impresiones de placentas teñidas con los métodos de Stamp, Giménez, Machiavello, Giemsa o el de Koster modificado, combinado con el análisis serológico por Fijación de Complemento o ELISA (Arricau y Rodolakis, 2005).

Diagnóstico bacteriológico.

Tinción. Se realiza a partir de frotis del cotiledón placentario, aunque también se puede utilizar el bazo, pulmón, hígado, rumen de fetos abortados o flujos vaginales. Estas muestras se pueden teñir por varios métodos: Stamp, Giménez, Macchiavello, Giemsa y Koster modificado (Arricau y Rodolakis, 2005; OIE, 2015). La observación microscópicamente se realiza con objetivo de inmersión (x500 o más aumento). La interpretación de los resultados requiere especial atención para evitar confusión con *Chlamydia abortus* o *Brucella* spp. La tinción de Stamp es utilizada frecuentemente en los laboratorios de diagnóstico

veterinario mientras que la tinción de Giménez es utilizada en cultivos celulares para investigación. Para el diagnóstico de rutina se recomienda combinar con las pruebas serológicas o métodos de PCR como pruebas confirmatorias (OIE, 2015).

Cultivo. El cultivo de *C. burnetii* no se recomienda para el diagnóstico rutinario debido a las dificultades y peligros asociados con este agente (Maurin y Raoult, 1999; Waag, 2007); sin embargo, el aislamiento y la caracterización de nuevas cepas es importante con fines de investigación. Los métodos básicos para aislar *C. burnetii* se realizan en huevos embrionados o en cultivos celulares (Waag, 2007). Con muestras muy multi-contaminadas, como las derivadas de placentas, descargas vaginales, heces o leche, es necesario inocular previamente en animales inmunocompetentes como ratones y el cultivo se realiza a partir de las muestras de bazo de los animales infectados (OIE, 2004).

Diluciones de la muestra homogenizada con PBS y antibióticos se inoculan a través del saco vitelino de huevos de gallina embrionados de 5 días, preferiblemente, libres de patógenos específicos (SPF). Los frotis se realizan de los sacos vitelinos recogidos después de 10-15 días de incubación, se tiñen y se examinan para comprobar la ausencia de contaminación bacteriana y determinar la presencia de *C. burnetii*. Para confirmar la presencia de *C. burnetii* se puede usar un análisis por PCR (OIE, 2015).

Para el aislamiento en cultivos celulares (“shell vial”) se pueden usar varias líneas celulares como células Vero o fibroblastos de pulmón de embrión humano (células HEL) o de ratón. Las células inoculadas con suspensiones de la muestra se disponen en monocapa y se incuban a 37 °C en 5% de CO₂ durante 5 a 7 días. La presencia de *C. burnetii* se detecta por Inmunofluorescencia o de PCR. Este método fue desarrollado para humanos pero puede adaptarse para animales (Maurin y Raoult, 1999; Waag, 2007; Angelakis y Raoult, 2010; OIE, 2015).

Diagnóstico serológico.

Existen varias técnicas que se han desarrollado para el diagnóstico serológico de infección por *C. burnetii*; de ellas el ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta (IFA - por sus siglas en inglés Indirect Immunofluorescent Assay), Fijación de Complemento (CFA - Complement Fixation Assay), y ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), son las técnicas utilizadas en el diagnóstico de rutina y en estudios epidemiológicos a larga escala para detectar anticuerpos contra *C. burnetii* (Fournier y cols., 1998; Guatteo y cols., 2006). La Organización Mundial de la Salud recomienda utilizar la prueba de Fijación de Complemento para el diagnóstico en animales y la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta para el diagnóstico en humanos. En los rumiantes IFA y ELISA son frecuentemente utilizadas en estudios de despistaje o screening para detección de *C. burnetii* (Lyoo y cols., 2017). Las pruebas ELISA e IFA son más sensibles que las pruebas de CFA para la detección de anticuerpos de respuesta en animales o seres humanos con fiebre Q aguda, pero no para la detección de anticuerpos en humanos con fiebre Q crónica y en vacas que han abortado (Arricau y Rodolakis, 2005).

La prueba de IFA utiliza antígenos de *C. burnetii* tanto de la fase I como de la fase II; si existen anticuerpos específicos en el suero se fijaran al antígeno y el conjugado fluorescente que se adiciona permitirá observar la formación de este complejo a través de un microscopio de fluorescencia (OIE, 2015).

La prueba de *Fijación de Complemento* es un método de fijación en frío, detecta la presencia de anticuerpos fijadores de complemento; esta prueba es específica, pero menos sensible que la IFI o ELISA. La infección reciente por fiebre Q es difícil de diagnosticar por las pruebas de FC porque los anticuerpos detectados por la prueba de FC pueden persistir después de una enfermedad aguda (Arricau y Rodolakis, 2005; OIE, 2015).

ELISA es la técnica más utilizada para el diagnóstico veterinario, tiene una alta sensibilidad y especificidad, permite realizar el análisis de muestras a gran escala, es una técnica confiable para determinar anticuerpos contra *C. burnetii* en

varias especies animales y en muestras de suero o de leche (Arricau y Rodolakis, 2005; Paul y cols., 2012; OIE, 2015). Actualmente esta prueba es recomendada para el diagnóstico de la fiebre Q en la Unión Europea (EFSA, European Food Safety Authority, y ECDC y cols., 2012; Paul y cols., 2013).

La serología es el método de laboratorio más barato actualmente disponible para diagnosticar la infección por *C. burnetii* en un rebaño (García-Ispuerto y cols., 2014).

Métodos moleculares.

El uso de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) y Real-time PCR (Rt-PCR) para la detección de DNA de *C. burnetii* en tejidos de placenta y moco vaginal ha cambiado radicalmente el diagnóstico de fiebre Q en medicina veterinaria. La sensibilidad de diagnóstico por PCR es muy alta y actualmente la aplicación de Real-time PCR (Rt-PCR) puede ser automatizada disminuyendo el riesgo de contaminación y el tiempo de respuesta para determinar el diagnóstico de abortos por *C. burnetii* y de animales que eliminen la bacteria. (Rodolakis, 2009). Estas técnicas se pueden utilizar además con muestras leche, calostro o heces (OIE, 2015). Recientemente, las secuencias completas del genoma de *C. burnetii* se hicieron disponibles, permitiendo una gran variedad de dianas de ADN (Angelakis y Raoult, 2010)

2.6. Lucha.

Las medidas de prevención están dirigidas a evitar la exposición de animales susceptibles a la contaminación animal y ambiental. La introducción de animales en los rebaños debe basarse en el diagnóstico serológico del rebaño de procedencia; los animales de rebaños seropositivos sólo pueden ser introducidos en granjas seropositivas y con vacunación (Arricau y Rodolakis, 2005; Rodolakis, 2009).

En rebaños infectados durante los brotes de fiebre Q y en especial durante el parto, los animales gestantes deben mantenerse en corrales separados; las placentas y fetos abortados deben retirarse rápidamente y eliminarse de modo apropiado para evitar su ingestión por perros, gatos o animales silvestres que podrían diseminar la enfermedad; se debe realizar la limpieza de las instalaciones sin inducir a la generación de aerosoles (Arricau y Rodolakis, 2005; Rodolakis, 2009; OIE, 2015). A las medidas higiénicas implementadas en los rebaños se suma una adecuada gestión en el manejo del estiércol, se debe evitar la dispersión del estiércol de granjas contaminadas; aunque no está evaluada la eficacia de la inactivación de *C. burnetii* mediante fermentación por compostaje o por descontaminación mediante tratamiento químico estos métodos son todavía recomendables (OIE, 2015).

La baja reducción en la carga bacteriana eliminada por los animales infectados al vacunarse, así como la alta resistencia de *C. burnetii* en el medio ambiente, plantea la necesidad de combinar medidas higiénicas y médicas para reducir aún más la carga infecciosa dentro de los rebaños infectados (Guatteo y cols., 2008). La vacunación a las hembras seronegativas de primer parto es altamente eficaz para evitar la eliminación de bacterias cuyo los animales se exponen a la infección. A su vez, la administración de antibióticos como las tetraciclinas, si bien reducen la incidencia de abortos, no previenen la eliminación de *C. burnetii* (Guatteo y cols., 2006; Taurel y cols., 2011).

En predios libres se debe reducir la introducción de animales, el reagrupamiento de rebaños, el contacto con animales silvestres y la infestación por garrapatas. Se debe analizar la combinación de medidas como la vacunación preventiva, el manejo del estiércol o la prohibición de visitantes (Taurel y cols., 2011; OIE, 2015). Medidas como el sacrificio de animales, la identificación de los rebaños y el control en el movimiento de los animales deben analizarse en las políticas estatales.

Tratamiento.

Poco se sabe acerca de la eficacia del tratamiento antibiótico en rumiantes y otros animales domésticos. El tratamiento profiláctico se recomienda eventualmente para reducir el riesgo de aborto (Arricau y Rodolakis, 2005). El tratamiento antibiótico consiste en la administración de dos dosis de tetraciclina (20 mg/kg/pv) en el último mes de gestación para reducir el número de abortos y la cantidad de bacterias que se eliminan durante el parto, sin embargo la eficacia de este tratamiento aún no se ha evaluado y no se ha observado la reducción deseada (Rodolakis, 2009; Angelakis y Raoult, 2010). En los rebaños no infectados se sugiere la separación de las hembras gestantes antes del parto y la administración profiláctica de tetraciclina (8 mg/Kg/día) en el agua de bebida para reducir la propagación del organismo (Angelakis y Raoult, 2010).

Vacunación.

La OIE recomienda a la vacunación como la estrategia más lógica para evitar la fiebre Q en humanos y en los animales expuestos, sin embargo aunque se han desarrollado vacunas contra la fiebre Q animal, en la mayoría de los países no están disponibles comercialmente. Las vacunas más eficaces son aquellas que contienen bacterias inactivadas o se preparan a partir de bacterias de fase I (OIE, 2015); varios autores confirman la protección que proporciona la vacuna en rebaños no infectados. La eliminación de bacterias al exterior en rebaños infectados se reduce pero no la evita, disminuyendo por lo tanto la contaminación en el ambiente (Guatteo y cols., 2006; Khalili Mohammad y cols., 2011), por ello se reitera que una vacuna sólo puede proteger a los animales sanos y no es capaz de tratar a los animales infectados (Arricau y Rodolakis, 2005; Guatteo y cols., 2008; OIE, 2015). Se sugiere la vacunación de al menos todas las vaquillas antes de su primer servicio al igual que la revacunación anual, especialmente de animales jóvenes, en zonas de riesgo (OIE, 2015), así como a animales de reemplazo (Taurel y cols., 2011) y a vacas en un estado de gestación avanzado (López-Helguera y cols., 2013).

En los rebaños infectados, la vacunación debe realizarse en todos los animales presumiblemente susceptibles, es decir, al menos en las vaquillas. La vacunación de las vacas lecheras debe realizarse cuando la seroprevalencia dentro del rebaño es baja, es decir, en los rebaños donde la infección aún no se ha propagado ampliamente (Guatteo y cols., 2008). Generalmente se reconoce que las vacunas preparadas con la fase I de las bacterias, confieren mayor protección que las preparadas con la fase II (Guatteo y cols., 2008; OIE, 2015). Las vacunas de fase II no confieren protección al ganado contra la infección de *C. burnetii* y no se observa que eviten los abortos o la eliminación de las bacterias por vía vaginal, en la leche o en las heces (Arricau y Rodolakis, 2005).

En Eslovaquia el uso de la vacunación de fase I en los bovinos durante los años setenta y ochenta redujo significativamente la presencia de fiebre Q en este país (Arricau y Rodolakis, 2005; Angelakis y Raoult, 2010). En Francia la única vacuna disponible es la de fase II inactivada y se utiliza ampliamente cuando se diagnostica fiebre Q en los rebaños; sin embargo, la vacunación con una vacuna de fase II no previene contaminaciones humanas, animales y ambientales (Arricau y Rodolakis, 2005). Un estudio realizado en España en hembras gestantes infectadas y no infectadas determinó que la vacunación durante el periodo final de la gestación permitió transmitir la inmunidad a sus terneros a través del calostro; los anticuerpos maternos de *C. burnetii* en los terneros persistieron durante tres meses (Tutusaus y cols., 2015).

Las vacunas de Fase I presentan dificultad y riesgos para su producción, además no existen aún pruebas que permitan diferenciar animales vacunados de animales infectados por *C. burnetii*. Nuevas vacunas se han desarrollado con base a la identificación de antígenos inmunodominantes en sueros de ratones experimentalmente infectados o a la clonación de nuevos antígenos inmunodominantes usando el mismo modelo de ratones BALB / c, los resultados sugieren su posible aplicación en el diagnóstico y la vacunación, sin embargo la protección conferida por estas proteínas se ha probado únicamente en animales de laboratorio y no se ha determinado aún su efectividad en los animales domésticos comparada con las vacunas de Fase I (Arricau y Rodolakis, 2005).

Erradicación.

La erradicación de la infección por *C. burnetii* en las poblaciones de animales es difícil porque la infección raramente causa síntomas y consecuentemente el desconocimiento de su presencia en el hato ganadero y el impacto por la eliminación de grandes cantidades de organismos en el medio ambiente, se convierten en una fuente de infección permanente para otros animales y humanos (Waag, 2007).

La compleja epidemiología y las características de *C. burnetii* plantean muchos problemas para el control y/o erradicación a nivel de rebaño, que requieren la selección y aplicación en conjunto de varias medidas encaminadas a reducir la circulación del agente y la exposición de animales y seres humanos (Natale y cols., 2009). Programas como los aplicados en los Países Bajos luego de la epidemia en humanos suscitada en el año 2007, determinaron que la aplicación de medidas de control veterinario adoptadas para reducir la exposición como el sacrificio, vacunación, prohibición de reproducción y transporte y, la combinación de un factor externo como las condiciones climáticas menos favorables para la transmisión de la enfermedad, contribuyeron a la reducción de los casos humanos. Se hace énfasis además en la necesidad de incrementar el conocimiento sobre la enfermedad, así como el trabajo coordinado entre los sistemas de salud humano y veterinario. En Dinamarca el programa aplicado determinó la notificación de la reducción de animales positivos de 54,5% en el año 2009 a 29,0% en el año 2010 (EFSA, European Food Safety Authority, y ECDC y cols., 2012).

Aunque se desconoce la situación epidemiológica de la enfermedad en muchos países, los programas de control y erradicación deben contar con la notificación obligatoria en sus estados y a la autoridad sanitaria mundial. De conformidad con el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE, la fiebre Q está inscrita en la Lista de la Organización y por lo tanto los Países y Territorios Miembros tienen la obligación de notificar los focos de la enfermedad (Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), 2015).

3. *Leptospira* spp.

Las leptospiras son espiroquetas de aproximadamente 0,1 mm de diámetro y 6-20 mm de largo que incluyen especies saprófitas y patógenas en el género *Leptospira*, de la familia Leptospiraceae y el orden Spirochaetales. El análisis filogenético ha permitido clasificar hasta el momento nueve especies patógenas de *Leptospira* (*L. alexyeri*, *L. alstonii*, *L. borgpetersenii*, *L. interrogans*, *L. kmetyi*, *L. kirschneri*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, , *L. weilii*,) Las especies saprófitas de *Leptospira* incluyen a *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. terpstrae*, *L. yanagawae*, , *L. vanthielii* y *L. wolbachii* (Levett, 2015). La clasificación de los serovares de *Leptospira* está basada en la expresión de epítopes expuestos en la superficie de la espiroqueta dentro de un mosaico de antígenos de lipopolisacáridos (LPS). La especificidad de esos epítopes depende de la composición de sus carbohidratos y de su orientación (Adler y Moctezuma, 2010).

La definición de la leptospirosis como enfermedad comenzó en 1886, cuyo Adolph Weil describió un tipo especial de ictericia acompañada de disfunción renal, hepatomegalia, conjuntivitis y erupción en la piel; en consecuencia se le denominó enfermedad de Weil. Aunque la etiología de la enfermedad se desconocía, se le asoció con aquellas ocupaciones en las que el individuo estaba en contacto con el agua. La primera identificación de *Leptospira* fue realizada en 1907 por el médico Arthur Stimson, jefe de investigación científica del Servicio Público de Salud en Estados Unidos (Barry, 1960) en secciones histopatológicas de un paciente fallecido por fiebre amarilla. Stimson denominó a la espiroqueta como *Leptospira* (del griego leptos: delgado; y del latín spira: espira) *interrogans*, por su semejanza morfológica con un signo de interrogación (Adler, 2015).

El primer aislamiento de la espiroqueta y la reproducción de la enfermedad lo realizó Ryokichi Inada de la Universidad Imperial en Kyushu, Fukuoka, Japón, al inyectar cobayos con la sangre de pacientes mineros afectados por la enfermedad de Weil. En los años siguientes, Inada y su grupo definieron las rutas de infección, los cambios histopatológicos, la excreción urinaria, morfología y motilidad de esta

espiroqueta en cobayos, así como en conejos, ratones y ratas. Demostraron que estas tres especies eran comparativamente resistentes a la enfermedad aguda. También tuvieron éxito en propagar las espiroquetas *in vitro* en un medio basado en riñón de cobayo emulsificado y descubrieron que la temperatura de crecimiento óptima era de 25 grados centígrados con pérdida de viabilidad a los 37 grados. A ese organismo le denominaron *Spirochaeta icterohaemorrhagiae* (Inada y cols., 1915) y hoy es conocido como la cepa de referencia (aún viable) *Leptospira interrogans* número 1. El grupo japonés también demostró que las ratas eran portadores renales de la *Leptospira* (Ido y cols., 1917) aunque permanecían asintomáticas. La conexión entre las ratas y la infección humana se estableció claramente con los mineros enfermos, ya que las ratas son huéspedes habituales de las minas cuya temperatura oscila alrededor de los 25 grados.

3.1. Etiología.

El género *Leptospira* pertenece a la familia *Leptospiraceae*, orden Spirochaetales, clase Schizomicetes. El género *Leptospira* comprende 21 especies agrupadas en saprofitas, patógenas y un grupo intermedio (Levett, 2015) como se puede observar en el cuadro 3. El análisis filogenético indica que las especies de *Leptospira* forman un grupo evolutivo único: el subgrupo de saprófitos, que incluye *Leptospira biflexa*, constituye la rama más profunda dentro del género, otro subgrupo incluye las especies patógenas tales como *Leptospira interrogans* y *Leptospira borgpetersenii* (Xue, Yan y Picardeau, 2009). Las leptospiras patógenas fueron anteriormente clasificadas como miembros de las especies de *Leptospira interrogans*; el género ha sido recientemente reorganizado y las leptospiras patógenas están ahora identificados en nueve especies con más de 250 serovares diferentes identificados en todo el mundo (Musso y La Scola, 2013; Levett, 2015; Yaakob, Rodrigues y John, 2015). Particularmente serovares patógenos y no patógenos pueden estar dentro de la misma especie de *Leptospira*.

Cuadro 3. Clasificación de *Leptospira*.

Patógenas	Intermedio	No patógenas
<i>Leptospira alexyeri</i>	<i>Leptospira licerasiae</i>	<i>Leptospira idonii</i>
<i>Leptospira weilii</i>	<i>Leptospira wolffii</i>	<i>Leptospira vanthieli</i>
<i>Leptospira borgpetersenii</i>	<i>Leptospira fainei</i>	<i>Leptospira biflexa</i>
<i>Leptospira santarosai</i>	<i>Leptospira inadai</i>	<i>Leptospira wolbachii</i>
<i>Leptospira kmetyi</i>	<i>Leptospira broomii</i>	<i>Leptospira terpstrae</i>
<i>Leptospira alstonii</i>		<i>Leptospira meyeri</i>
<i>Leptospira interrogans</i>		<i>Leptospira yanagawae</i>
<i>Leptospira kirschneri</i>		
<i>Leptospira noguchii</i>		

Las leptospiras son bacterias helicoidales, aerobias obligadas, miden 0,1 μm por 6–20 μm , presentan una curvatura en forma de gancho en uno o ambos extremos. Son oxidasas positivas; crecen en medios con Vitamina B1 y B12 o con albumina bovina a un pH de 6,8 - 7,4; su temperatura óptima de crecimiento es de 28 a 30°C. Las leptospiras están constituidas por un cuerpo citoplasmático, un axostilo y una membrana envolvente que recubre ambas estructuras. El axostilo está formado por dos filamentos axiales que se insertan en la extremidad del cuerpo citoplasmático y son responsables de la motilidad (Levett, 2001; Céspedes Z, 2005; Adler y Moctezuma, 2010).

La doble membrana de *Leptospira* está formada por una membrana citoplasmática estrechamente asociada a los peptidoglicanos de la pared celular y superpuestos por una membrana externa que contiene lipopolisacáridos (LPS) además de proteínas estructurales y funcionales. Los LPS se constituyen en el principal antígeno para *Leptospira* y son estructural e inmunológicamente similar a los LPS de organismos Gram negativos. Una gran proporción de las proteínas de la membrana externa son lipoproteínas conocidas como LipL32, LipL21, LipL41; Además están presentes proteínas integrales de membrana como la porina OMP L1 y el sistema de secreción tipo 2 (T2SS) (Adler y Moctezuma, 2010). Las OMPs al estar expuestas en la superficie celular están en condiciones de interactuar con el

medio ambiente o contribuir a la patogénesis mediante la interacción con el hospedero (Cullen, Haake y Adler, 2004).

Hospedadores.

Los huéspedes de mantenimiento y los serovares de *Leptospira* varían en todo el mundo, por ello es necesario un conocimiento básico de los mismos para una mejor comprensión de la epidemiología de la leptospirosis en cada región (Lilenbaum y Martins, 2014). Las diferentes cepas patógenas de leptospirosis pueden afectar a un gran número de especies animales y al humano y su papel como hospedadores de mantenimiento o accidentales está determinado por la adaptación o preferencia del serovar involucrado. Los hospedadores de mantenimiento como su nombre lo indica, actúan como reservorios continuos de un serovar en un área geográfica determinada y se constituyen en la fuente de infección de ese serovar para los animales de la misma u otra especie (Alonso-Yicoberry, García-Peña y Ortega-Mora, 2001). Los animales se infectan generalmente a una edad temprana y mantienen las leptospirosis viables en los túbulos renales, excretándolas intermitentemente en la orina, esta excreción crónica incrementa con la edad del animal (Levett, 2001; Céspedes Z, 2005).

La mayoría de serovares de *Leptospiras* patógenas se asocian a una especie animal determinada, sin embargo esta asociación no es absoluta y la base molecular para esta llamada especificidad del hospedador es aún desconocida. Una especie animal puede ser reservorio de varios serovares y diferentes especies animales pueden ser reservorios de un mismo serovar (Alonso-Andicoberry y cols., 2001; Adler y Moctezuma, 2010). Los hospedadores de mantenimiento son a menudo las especies de vida silvestre y, a veces, los animales domésticos y de granja (Bolin, 2003). Entre los principales hospedadores domésticos de las cepas patógenas están el ganado vacuno, cerdos, perros y particularmente los roedores (Yaakob, Rodrigues y John, 2015). El ganado bovino alberga frecuentemente los serovares hardjo, pomona y grippotyphosa; en los cerdos se albergan los serovares pomona, tarassovi o bratislava; las ovejas pueden albergar los serovares hardjo y pomona y los perros al serovar canicola (Bolin, 2000; Céspedes Z, 2005)

3.2. Leptospirosis en humanos.

La leptospirosis es una de las zoonosis más importantes y difundida en todo el mundo (Bharti y cols., 2003). Más de un millón de casos y 58900 muertes debido a leptospirosis ocurren anualmente en el mundo; tasas de mortalidad superiores al 20% y de hasta 70% para el síndrome hemorrágico pulmonar grave se presentan en las regiones más pobres, con una infraestructura sanitaria deficiente y en las regiones tropicales (Bharti y cols., 2003; Costa y cols., 2015; Torgerson y cols., 2015).

La infección en el ser humano será siempre accidental ya que no actúa como hospedador de mantenimiento de ningún serovar (Alonso-Yicoberry, García-Peña y Ortega-Mora, 2001). Los seres humanos se infectan por contacto directo con la orina o los tejidos de los animales portadores infectados o indirectamente por contacto con el agua contaminada con orina infectada. Personal que trabaja en agricultura, ganadería, minería o el desarrollo de diferentes actividades que impliquen contacto con agua contaminada suponen los principales factores de riesgo (Alonso-Yicoberry, García-Peña y Ortega-Mora, 2001; Adler y cols., 2011). Una amplia variedad de especies animales, tanto silvestres como domésticos, pueden servir como fuentes de infección para el ser humano, principalmente roedores, perros, bovinos o cerdos (Acha y Szyfres, 2001; Assenga y cols., 2015).

La leptospirosis en los seres humanos puede variar en gravedad de acuerdo con el serovar infectante de *Leptospira*, y la edad, la salud y la respuesta inmunológica del paciente. La leptospirosis puede ser leve y autolimitante o grave y fatal (Adler y Moctezuma, 2010). La enfermedad comienza predominantemente con un síndrome febril inespecífico caracterizado por dolor de cabeza, fiebre (típicamente a 39 ° C) malestar, mialgia, enrojecimiento de los ojos y a veces erupción transitoria; que es clínicamente difícil de distinguir de otras causas de enfermedad febril. Posteriormente, desde una sintomatología leve o repentina, puede llegar hasta complicaciones más serias como ictericia, hemorragia pulmonar e insuficiencia renal y hepática, que pueden resultar fatales; estas complicaciones

se presentan en el 5-15% de los casos clínicos de leptospirosis y la letalidad puede ser igual o mayor al 50% (Vivian y cols., 2009; Adler y Moctezuma, 2010; Torgerson y cols., 2015).

El diagnóstico clínico no es suficiente por la sintomatología que presentan los pacientes; la presencia de signos clínicos y una historia clínica de contacto con animales debe ir acompañada de la confirmación a través del diagnóstico de laboratorio; las pruebas que se utilizan también para estudios epidemiológicos se realizan a través de la detección de anticuerpos (serodiagnóstico), cultivo de las bacterias de sangre, orina o tejidos o mediante la demostración de la presencia de leptospiras en los tejidos utilizando anticuerpos marcados con marcadores fluorescentes, la inmunotinción o el uso de pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (WHO, 2003).

Entre las pruebas serológicas más utilizadas están la prueba de aglutinación microscópica (MAT) considerada la prueba de referencia o estándar y la prueba de ELISA. El ensayo de MAT detecta los anticuerpos aglutinantes en suero que pueden ser tanto IgM como IgG, para ello se incuban los sueros de los pacientes con el antígeno de los serovares de *Leptospira* y posteriormente se examinan en microscopio de campo oscuro para observar la aglutinación y determinar el título de la muestra. El CDC, estableció un título de 1/200 para definir un caso probable de leptospirosis; esta referencia es viable para poblaciones donde la exposición es eventual o poco recuente; en áreas endémicas es necesario utilizar títulos más altos como 1/800 o inclusive hasta 1/1600 en pacientes sintomáticos. Después de la infección aguda se pueden observar títulos extremadamente altos hasta de 1/25600 (Céspedes Z, 2005). Tanto la especificidad y sensibilidad del MAT son muy altos; sin embargo, el MAT exige cultivos vivos de diferentes serovares de *Leptospira* prevalentes en un área geográfica determinada (Adler y Moctezuma, 2010); por lo tanto es necesario contar con instalaciones y el personal capacitado para el cultivo y mantenimiento de las bacterias; además la prueba es técnicamente exigente y requiere de mucho tiempo. Cuyo la cepa causante de la enfermedad no está en el panel de prueba, los anticuerpos pueden no ser detectables o solo se encuentra un título bajo con un serovar que antigénicamente

se asemeja al serovar causante. Este resultado no puede ser determinante por lo que se recomienda incluir la prueba de ELISA (WHO, 2003).

ELISA puede detectar anticuerpos IgM; un indicativo de que la infección puede ser actual o reciente; sin embargo, la sensibilidad y la especificidad no es mayor a MAT. En el comercio existen kits que permiten desarrollar las pruebas en menor tiempo, además esta prueba permite estandarizarla y no requiere el mantenimiento de cultivos de leptospiras en el laboratorio (WHO, 2003; Adler y Moctezuma, 2010; Pinto y cols., 2015).

El tratamiento para la leptospirosis en los casos leves se basa en la administración de antibióticos orales como amoxicilina, ampicilina, doxiciclina o eritromicina. En los casos graves los pacientes deben ser tratados con altas dosis de penicilina intravenosa (WHO, 2003).

3.3. Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis bovina.

La leptospirosis es una de las zoonosis bacterianas más extendidas en el mundo y de mayor impacto en la salud y producción de ganado. La leptospirosis bovina se asocia con alteraciones reproductivas incluidos abortos, muerte fetal, infertilidad, recién nacidos débiles y pérdida en la producción de leche (Alonso-Andicoberry y cols., 2001; Zuerner y cols., 2011; Nagalingam y cols., 2015).

Las infecciones con *Leptospira* pueden cursar con diferentes cuadros clínicos, ya sea en una infección aguda con fiebre, hematuria, hemoglobinuria, meningitis e incluso potencialmente letal; en los hospedadores de mantenimiento cursa con una infección crónica con pocos signos externos de la enfermedad y cuya única sintomatología aparente es el fallo reproductivo (Alonso-Andicoberry y cols., 2001; Zuerner y cols., 2011). La transmisión ocurre generalmente a través de lesiones de la piel o de las membranas mucosas con las bacterias presentes en la orina, así como en el agua, suelo, y pasto contaminados con la orina de animales infectados (Schoonman y Swai, 2010).

En los bovinos la causa más común de la leptospirosis es la infección por leptospiras que pertenecen al serovar Hardjo de las cuales se han identificado dos cepas: Hardjoprajitno (*Leptospira interrogans*) y Hardjo bovis (*L. borgpetersenii*); estas cepas son serológicamente indistinguibles no obstante tienen diferencias genéticas, epidemiológicas y patogénicas (Mughini-Gras y cols., 2014). Estas son cepas adaptadas al hospedador. Las infecciones que se presentan en los bovinos también son causadas por cepas transportadas por animales de vida libre o animales domésticos de otras especies (Martins y Lilenbaum, 2017). En América los serovares predominantes son Pomona, Hardjo y Grippotyphosa (Acha y Szyfres, 2001).

La prevalencia de la enfermedad varía notablemente entre los distintos países, e incluso entre las diferentes regiones de un mismo país (Alonso-Andicoberry y cols., 2001; Alonso-Andicoberry y cols., 2001). Así tenemos que se observan prevalencias de 28,1% en Tailandia (Chadsuthi y cols., 2017); 47,27% en Bangladesh (Parvez y cols., 2015), 87% en India (Natarajaseenivasan y cols., 2011), 64% en Egipto (Horton y cols., 2014). En Nueva Zelanda en estudios realizados en granjas y mataderos se demostró que el 69% de los rebaños de ganado vacuno y el 44% de ovejas destinadas a sacrificio eran positivos a leptospirosis (Fang y cols., 2015).

En el continente americano, Canadá presenta las prevalencias más bajas 0,8% (Van Do Weyer y cols., 2011). En Estados Unidos, la leptospirosis bovina es causada principalmente por el serovar Hardjo, seguida de los serovares Pomona y Grippotyphosa; la prevalencia de la infección con otros serovares varía con las diferentes condiciones de cría (Bolin, 2003).

La leptospirosis bovina es endémica en Brasil; varios estudios se han realizado observándose prevalencias que van del 16% al 98.8% (Vasconcellos y cols., 1997; Lilenbaum y Souza, 2003; Thompson y cols., 2006; Mineiro y cols., 2007; Figueiredo y cols., 2009; D. P. Chiebao y cols., 2015). En un estudio realizado en pequeños rebaños bovinos al sur de Chile, se determinó que el 75 % de los rebaños mostraron títulos serológicos contra uno o más serovares de *Leptospira*,

donde *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo fue el serovar más frecuente (81%) (Salgado y cols., 2014).

En Colombia la prevalencia de leptospirosis se reporta en 21,7%, observándose valores que difieren de 14,4% en la región yina a 38,2% en la región del norte del caribe (Hernández-Rodríguez y cols., 2011). Por otra parte, en un estudio realizado durante los años 2002 a 2005 se observó el 16,4% de prevalencia individual, 32,5% a nivel de rebaño y *L. interrogans* Hardjo como serovar predominante (Zuluaga L, 2009). Estudios realizados en diferentes localidades de Venezuela determinaron prevalencias de 42,50% a 65,18% (Alfaro y cols., 2007). En un estudio realizado en vacas en producción se observó una prevalencia de 74,04% y el serovar predominante fue Hardjo con un 34% (Gonzalez Gontafalla y Rivera Pirela, 2015).

En Ecuador, no existe información que determine la prevalencia a nivel nacional. En el año 2010 se notificó a la OIE, la presencia de 46 focos de leptospirosis bovina en 150 animales (OIE, 2010). Por otra parte, un estudio realizado en 547 muestras de orina de bovinos procedentes de las regiones yina y costera señaló una positividad de 22,32% mediante la adaptación de un protocolo de PCR (Baquero y cols., 2010).

Factores de riesgo relacionados con el hospedador.

Los hospedadores de mantenimiento constituyen la fuente de infección del serovar que mantienen tanto para mamíferos de la misma especie como de otra. Estos hospedadores se caracterizan especialmente por la receptividad a la infección por el serovar que mantienen, baja patogenicidad del microorganismo en el hospedador y la transmisión eficaz de la infección a los animales de la misma especie (Alonso-Andicoberry y cols., 2001).

La edad de los animales, es citada por varios autores como factor de riesgo y se refieren al mayor tiempo de exposición durante la vida del animal (Mughini-Gras y cols., 2014) y al estado de portador renal (Miller y cols. 1991; Levett, 2004);

las bacterias se alojan en los túbulos renales proximales de los animales y son excretadas al exterior contaminando el medio ambiente a largo plazo (Adler y Moctezuma, 2010).

Por otra parte el ganado expuesto previamente a la infección es refractario a la reinfección durante años (Hoeden, 1958; Ellis, 1983; Alonso-Andicoberry y cols., 2001).

Factores de riesgo relacionados con el manejo y medio ambiente.

Las leptospiras son microorganismos bastante sensibles a las condiciones ambientales; su supervivencia en el medioambiente está relacionada a ciertas condiciones como temperatura templada (25 C), ambiente húmedo, pH neutro o ligeramente alcalino y presencia de materia orgánica. Las áreas con diferentes fuentes de agua que sirven como abrevaderos o las zonas de pastoreo extensivo que tienen áreas comunes de alimentación y de riego, congregan a un gran número de animales del rebaño o silvestres y son las que más frecuentemente están implicadas en los focos de leptospirosis; por ello se relaciona la enfermedad con cierta estacionalidad principalmente por época de lluvias (Alonso-Andicoberry y cols., 2001; Chiebao y cols., 2015).

El mantenimiento de la infección por serovares accidentales en una región geográfica está determinada por la existencia de una humedad relativa alta que facilite la supervivencia de las leptospiras en el medio ambiente (Alonso-Andicoberry y cols., 2001; Levett, 2001). En las regiones tropicales y subtropicales, las condiciones ambientales favorecen la supervivencia y transmisión de *Leptospira* (Parvez y cols., 2015), en estas zonas, las infecciones con *Leptospira interrogans* serovar hardjo se observan en la mayoría de los casos de leptospirosis bovina (Hernández-Rodríguez y cols., 2011).

Las regiones tropicales tienen muchas particularidades que afectan a la aparición de la infección, así como a la gravedad de la enfermedad. Además de las condiciones geográficas y aspectos como el clima o la topografía, factores como el

manejo y las prácticas de cría, la frecuencia de asistencia veterinaria, pueden afectar la seroprevalencia general y también la distribución de un serovar (Martins y Lilenbaum, 2013).

Con respecto al manejo, la aptitud lechera y el tipo de alimentación se citan entre otros factores que inciden en la presentación de la leptospirosis bovina. Las explotaciones de aptitud lechera son más susceptibles debido principalmente al manejo en sistemas intensivos o semi-extensivos que favorecen el hacinamiento y contacto entre los animales sanos y enfermos o con material contaminado; además existe la introducción al rebaño de ordeño de animales de primera gestación que no están expuestos y que son totalmente receptivos a la infección. La alimentación está relacionada con la eliminación de leptospiras en la orina; el pH de la orina baja cuyo los animales son alimentados con suplementos como los ensilados de grano, y posiblemente disminuye el número de leptospiras viables eliminadas (Alonso-y cols., 2001a).

Factores de riesgo relacionados con el agente.

L. interrogans a diferencia de *L. borgpetersenii* puede sobrevivir en el medio ambiente fuera del huésped durante largos periodos de tiempo y en diversos hábitats naturales así como en aguas superficiales; las dos especies son los principales agentes de la leptospirosis. Se conoce que *L. biflexa* y *L. interrogans* tienen un amplio repertorio de genes reguladores que les podrían permitir rápidamente realizar cambios adaptativos para su supervivencia en diferentes condiciones. A diferencia de las cepas saprofíticas, *L. interrogans* es más sensible a la luz UV. Estas bacterias también poseen mecanismos para contrarrestar el estrés oxidativo, así *L. biflexa* posee una superóxido dismutasa que está ausente en los patógenos y una catalasa en *L. interrogans* y *L. borgpetersenii* (ausente en *L. biflexa*) (Xue y Picardeu, 2009). Otros factores de virulencia detectados por técnicas de mutagénesis son los flagelos y la proteína Loa22 (Adler y cols., 2011).

Los antígenos principales lo constituyen las proteínas superficiales de adhesión que se encuentran en la estructura de doble membrana de la bacteria y

son similares estructuralmente e inmunológicamente a los lipopolisacáridos (LPS) de los organismos Gram negativos (Romero Becerra y Veloza, 2014). La lipoproteína LipL32 es una de las proteínas más importantes y abundantes que se encuentra únicamente en la membrana externa de las *Leptospiras* patógenas, es altamente inmunogénica y constituye la defensa principal a la respuesta de anticuerpos humanos y animales (Vivian y cols., 2009; Adler y cols., 2011).

Contagio-Transmisión.

Las leptospiras patógenas viven en los túbulos renales proximales de los riñones de los portadores aunque otros tejidos y órganos también pueden servir como fuente de infección. Desde los riñones, las leptospiras se excretan en la orina y pueden contaminar el suelo y el agua (Adler y Moctezuma, 2010). Muchos hospedadores de mantenimiento de un determinado serovar eliminan durante un periodo de tiempo prolongado gran cantidad de bacterias en su orina (Alonso-Andicoberry, 2001a).

La transmisión de *Leptospira* es tanto horizontal como vertical en los animales y hospedadores de serovares adaptados (Bermúdez y cols., 2010; Romero Becerra y Veloza, 2014). La transmisión de las infecciones entre los hospedadores permanentes y en este caso el ganado, suele ser directa e implica el contacto con orina, placenta, descargas uterinas post abortos y leche contaminados o por contacto sexual o vía transplacentaria (Bolin, 2003; Parvez y cols., 2015). Una transmisión por contacto directo puede producirse de muchas maneras, siendo una de las más importantes el ingreso del agente patógeno por vía respiratoria o conjuntival, proveniente de núcleos goticulares formados por la dispersión de la orina de animales infectados (Alonso-Andicoberry, 2001a).

La transmisión indirecta juega un rol importante en la propagación de la infección y se da por la exposición a un ambiente contaminado con material infeccioso de los animales; generalmente el contacto con agua de bebida, pastos y/o alimentos contaminados con la orina de los huéspedes de mantenimiento. Las condiciones ambientales son fundamentales para determinar la frecuencia de

transmisión indirecta (Alonso-Andicoberry y cols., 2001). La transmisión de *Leptospira* se produce más fácilmente en las zonas tropicales húmedas que en las zonas intermedias o frías. En las zonas tropicales y subtropicales, las infecciones por *Leptospira interrogans* serovar hardjo se cuenta para la mayoría de las infecciones por *Leptospira* en bovinos (Hernández-Rodríguez y cols., 2011).

3.4. Patología

Después de ingresar al animal a través de las piel y mucosas, (Xue Yan y Picardeau, 2009) las leptospiras circulan en el torrente sanguíneo y se diseminan en el hígado, riñones, pulmones, tracto reproductivo (placenta) y líquido cefalorraquídeo (Gasque, 2008). La fase de bacteriemia puede durar hasta siete días y las lesiones y síntomas consiguientes se presentan por la acción de toxinas o componentes celulares tóxicos. La hemolisina que se produce durante este periodo causa una hemolisis intravascular extensa que se refleja en hemoglobinuria. Una vez que aparecen los anticuerpos circulantes, las leptospiras se eliminan de la circulación y de los tejidos por opsonofagocitosis (Adler y Moctezuma, 2010).

En las vacas gestantes la invasión al tracto reproductivo durante la fase septicémica de la enfermedad provoca la muerte del feto a veces con degeneración placentaria que finalmente deriva en aborto. Las leptospiras pueden persistir en los riñones y el tracto reproductivo durante meses después de la infección (Segura-Correa y cols., 2003). La infección persistente del tracto reproductivo puede ser la manifestación más importante de la leptospirosis en los bovinos (Lilenbaum y Martins, 2014) y es característica de las infecciones por el serovar Hardjo, que generalmente implican disminución de la eficiencia reproductiva y de la producción de leche (Bolin, 2003).

Respuesta inmune.

Aún no están claros los mecanismos de inmunidad del hospedero frente a *Leptospira*. En la mayoría de las especies animales y el hombre, la inmunidad contra la leptospirosis es predominantemente humoral y puede ser conferida a

través de la transferencia pasiva de anticuerpos (Adler y Moctezuma, 2010; Murray, 2013). Se cree que la inmunidad adquirida naturalmente que protege contra la reinfección está relacionada por la acción de la inmunidad humoral (Bharti y cols., 2003).

En los bovinos, la inmunidad está relacionada con una respuesta Th1 mediada por el IFN- g activado por las células T CD4. En estudios realizados para investigar el papel de la inmunidad mediada por células en infecciones por leptospirosis, se demostró la presencia de células T CD4 en bovinos vacunados con *L. borgpetersenii*; estas células T tuvieron una respuesta proliferativa *in vitro*, con la producción de interferón después de la estimulación con un antígeno de *Leptospira* (Bharti y cols., 2003).

Lesiones.

El daño en el endotelio de los pequeños vasos sanguíneos es la primera lesión que se observa en el proceso infeccioso, seguido de una isquemia localizada en los órganos, que deriva en necrosis tubular renal, daño hepatocelular y pulmonar, meningitis, miositis y placentitis (Adler y Moctezuma, 2010).

En los riñones se muestran pequeñas lesiones focales de 1 a 3 mm de nefritis intersticial con infiltración linfocítica e histiocítica, fibrosis y dilatación de los túbulos renales (Cousins, Robertson y Hustas, 1985). En los casos graves ocurren hemorragias, ictericia, y con frecuencia, se observa disminución de plaquetas así como una granulocitosis leve y esplenomegalia (Adler y Moctezuma, 2010).

Después de una infección sistémica, las leptospiras se pueden localizar directamente en la placenta o la trompa uterina; durante la gestación descienden al útero y la placenta ocasionando placentitis crónica, fibrosis cotiledonaria, anemia y consecuentemente la emaciación fetal. La lisis de los eritrocitos causada por las sustancias tóxicas liberadas por los anticuerpos durante la infección, probablemente después de atravesar la barrera placentaria causan anoxia del feto. Los cotiledones se presentan edematosos, con una coloración marrón claro y áreas

intercotiledonarias amarillentas; el feto muere debido a la placentitis y posterior daño vascular de los cotiledones (Romero Becerra y Veloza, 2014).

3.5. Diagnóstico.

Dada la sintomatología de la leptospirosis no siempre es posible establecer un diagnóstico clínico preciso, los síntomas no son altamente específicos y pueden confundirse con los producidos por varios patógenos (Hernández-Rodríguez y cols., 2011). La leptospirosis bovina debe diferenciarse de las enfermedades que cursen con hemoglobinuria, aborto, disminución de la producción láctea con presencia de mamitis. La babesiosis, hemoglobinuria postparto e infecciones por clostridios pueden cursar con hemólisis, hematuria, hemoglobinuria y daño hepatorenal, lo que puede dar lugar a confusión con la fase hemolítica de leptospirosis. El aborto se presenta en otras enfermedades reproductivas muy generalizadas en los rebaños como brucelosis, neosporosis, rinotraqueítis infecciosa bovina entre otras, por lo que la identificación de la causa solo puede realizarse por medio de ensayos de laboratorio (Alonso-Andicoberry y cols., 2001a).

El diagnóstico clínico debe estar siempre acompañado del diagnóstico de laboratorio. Las técnicas que se utilizan se basan en la detección del organismo o su ADN en tejidos o fluidos corporales de animales o, a través de pruebas serológicas que detectan anticuerpos contra las leptospiras (Bharti y cols., 2003; Bolin, 2003). Las pruebas serológicas son las más utilizadas para el diagnóstico rutinario de leptospirosis, así como en estudios epidemiológicos (Alonso-Andicoberr y cols., 2001a). Estas pruebas son la aglutinación microscópica (MAT-Microagglutination Test), el ensayo de hemaglutinación indirecta (IHA) o ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Con respecto a la detección de las leptospiras las técnicas utilizadas comúnmente incluyen la inmunofluorescencia y PCR (Levett, 2001; Bharti y cols., 2003; Adler y Moctezuma, 2010).

Diagnóstico serológico.

Prueba de Aglutinación Microscópica (MAT). Es la prueba oficial o de referencia recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el diagnóstico serológico de la leptospirosis. Esta prueba detecta los anticuerpos aglutinantes en suero; tras la incubación de los sueros con el antígeno de los serovares de *Leptospira*, estos son analizados a través de un microscopio de campo oscuro para observar la aglutinación y determinar el título de la muestra (Céspedes Z, 2005). MAT destaca por su alta sensibilidad y especificidad; por otra parte permite identificar el serovar de *Leptospira* comprometido en la infección. No obstante, no es posible diferenciar entre los anticuerpos resultantes de la infección o de la vacunación (Adler y Moctezuma, 2010), además la reactividad cruzada entre serotipos es motivo de preocupación. La ausencia de serovares específicos en el ensayo puede determinar un falso negativo como resultado (Baquero y cols., 2010).

Para el desarrollo de la prueba es necesario que se utilicen grandes paneles de cepas representativas para mejorar la sensibilidad de la prueba (Vinetz, 2004; Schoonman y Swai, 2010) debido a que los títulos bajos de anticuerpos o ausencia de reactores que se pueden observar en algunas muestras no descartan la posibilidad de infección con otros serovares y que los animales pueden estar infectados con un serovar no incluido en los paneles de antígeno utilizados (Aslantaş y Özdemir, 2005; McBride y cols., 2005; Schoonman y Swai, 2010).

Esta prueba es muy utilizada para estudios de prevalencia o de diagnóstico a nivel de rebaño, sin embargo no es adecuada para la detección individual de portadores, por lo que en programas de control se sugiere combinar con otras pruebas como PCR (Toyokawa, y cols., 2011; Otaka y cols., 2012; Hamond y cols., 2015).

Como se mencionó en la descripción de esta prueba en el diagnóstico en humanos, MAT requiere del mantenimiento de cultivos vivos de todos los serovares para su uso como antígeno y de personal experimentado para el

desarrollo del ensayo y su interpretación. Además esta prueba presenta otros inconvenientes como el costo, dificultad y el riesgo asociado con la manipulación continua de las bacteria, (Céspedes Z, 2005; Toyokawa y cols., 2011).

ELISA. Esta técnica es ampliamente utilizada en estudios epidemiológicos por ser altamente sensible y específica a un serotipo (OIE, 2008); se utiliza para la detección de anticuerpos en leche y en suero, permitiendo, además, diferenciar entre IgG e IgM (Gonzalez Gontafalla y Rivera Pirela, 2015). Las pruebas de ELISA se han desarrollado utilizando antígenos especialmente con base a lipoproteínas recombinantes tales como LipL32, o la porina de membrana externa OmpL1 de *Leptospira* (Adler y Moctezuma, 2010). En el diagnóstico veterinario este ensayo es preferible a la prueba de MAT porque permite el análisis de un gran número de muestras en menor tiempo, no requiere el cultivo y mantenimiento de la bacteria, es de fácil estandarización, disminuyendo por lo tanto el riesgo sanitario para el personal de laboratorio; su costo es accesible y existe una amplia disponibilidad de kits comerciales (Parvez y cols., 2015). En el ELISA las reacciones cruzadas son poco frecuentes a diferencia de MAT, sin embargo, una de sus desventajas es que no permite diferenciar entre anticuerpos vacunales y de infección (Gonzalez y cols. 2015).

Detección de leptospiras.

El cultivo es una prueba poco conveniente para el diagnóstico clínico debido a su baja sensibilidad, es costosa, tarda muchas semanas y está disponible generalmente en laboratorios de referencia (Bolin, 2003; Céspedes Z, 2005; Pinto y cols., 2015).

La inmunofluorescencia permite identificar leptospiras de muestras de tejido, sangre o sedimento urinario. Se caracteriza por su rapidez y sensibilidad. El conjugado del anticuerpo fluorescente no es específico del serovar y es necesario un examen serológico para identificar el serovar infectante (Bolin, 2003).

La prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) destaca por su alta sensibilidad y rapidez para la detección de leptospiras en tejidos y fluidos. La PCR en tiempo real es más rápida que la PCR normal y menos sensible a la contaminación (Picardeau, 2013). Este método es una herramienta muy importante para la identificación de portadores (Pinto y cols., 2015); sin embargo, por su implementación y costo no es utilizado generalmente para el diagnóstico de *Leptospira* (Parvez y cols., 2015); su aplicación está más dirigida a la investigación.

3.7. Lucha.

En todo el mundo, la leptospirosis ha sido reportada como una de las principales causas de fracaso reproductivo en el ganado bovino y otros rumiantes (Lilenbaum y Martins, 2014).

El control de la leptospirosis en el rebaño debe estar dirigida a acciones básicas como la identificación y tratamiento de los portadores renales, tratamiento con antibióticos de los animales infectados, cuarentena de los animales que ingresan a la granja y la vacunación con los serovares circulantes en el rebaño (Pereira y cols., 2013; Lilenbaum y Martins, 2014; Mughini-Gras y cols., 2014).

Las medidas higiénico sanitarias deben formar parte del programa general de control de la leptospirosis y deben estar dirigidas a minimizar el riesgo de introducción del patógeno al rebaño desde fuentes externas y prevenir la propagación de la infección dentro y fuera del rebaño; para ello es necesario mantener el control de hospedadores tanto de mantenimiento silvestres y de hospedadores domésticos y tomar medidas como: reducir el pastoreo con otras especies, evitar el uso de fuentes de agua comunales, limpieza regular de las áreas de ordeño, control de roedores, evitar el uso del toro para la monta, entre otras (Alonso-Andicoberry y cols., 2001; Mughini-Gras y cols., 2014).

Tratamiento.

El tratamiento antibiótico elimina las leptospiras de los tejidos y disminuye la leptospiuria, aunque no se elimina completamente el estado de portador renal. Los antibióticos más utilizados son la dihidroestreptomicina en dosis de 25 mg/Kg, la clortetraciclina (20 mg/Kg)(Alonso-Andicoberry y cols., 2001; Mughini-Gras y cols., 2014) administrada por vía parenteral (Gonzalez Gontafalla y Rivera Pirela, 2015) o la oxitetraciclina larga acción en dosis de 20 mg / kg, por vía intramuscular en dos dosis con 10 días de intervalo, se ha demostrado que es eficaz en el tratamiento de las infecciones por el serovar Hardjo (Bolin, 2003; Gonzalez Gontafalla y Rivera Pirela, 2015). La administración de antibióticos generalmente se utiliza al inicio del programa aunque también se recomienda su uso como parte del proceso de cuarentena de los animales antes de ser ingresados en el rebaño (Mughini-Gras y cols., 2014; Martins y Lilenbaum, 2017). Se debe considerar que en algunos países puede ser costoso el uso de antibióticos como la dihidroestreptomicina y el tiempo de restricción de la leche, pueden generar un incremento en el costo del programa (Martins y Lilenbaum, 2017).

Vacunación.

Es una de las medidas más importantes a considerar para el control de la leptospirosis. No obstante, su eficacia varia; las vacunas disponibles en el mercado están dirigidas a los serotipos homólogos por lo que confieren protección limitada frente a cepas distintas de un mismo serovar y no proporcionan protección cruzada entre serovares distintos (Alonso-Andicoberry y cols., 2001a), además no evitan el desarrollo de portadores renales y los animales vacunados pueden permanecer en la granja como una fuente de infección (Adler y Moctezuma, 2010).

Actualmente las vacunas (bacterinas) están disponibles en todo el mundo y se utilizan ampliamente en Australia, Nueva Zelanda, Europa y Estados Unidos. En los países tropicales su uso es muy limitado y no constituye una práctica habitual de los programas de manejo. Estas vacunas generalmente están compuestas por cinco a diez serovares leptospíricos inactivados: sin embargo, la inmunidad sigue

siendo serovar-específica. Esto determina que las vacunas elaboradas con cepas internacionales de referencia pudiesen no conferir protección contra infecciones causadas por cepas nativas (Martins y Lilenbaum, 2017). Por lo tanto, se hace necesario identificar el serovar infectivo que afecta al rebaño para la adecuada elección de la vacuna y su implementación en el plan sanitario del rebaño (Lilenbaum y Martins, 2014).

El plan de vacunación para la leptospirosis bovina generalmente inicia con la aplicación de la vacuna a terneros de 4 a 6 semanas de edad, seguida de una segunda dosis después de 4 y 6 semanas, con una revacunación anual o semi-anual (Mughini-Gras y cols., 2014).

4. *Neospora caninum*.

Neospora caninum es un protozoario perteneciente al phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, orden Eucoccidiida y familia Sarcocystidae, junto con los géneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Haemmondia*, *Frenkelia* y *Besnoitia* (Dubey y cols., 1988) parasita al canino como hospedador definitivo y al ganado bovino como principal hospedador intermediario y es el agente etiológico de una enfermedad polisistémica, la neosporosis (Dubey, Schares y Ortega-Mora, 2007).

El reconocimiento inicial de *N. caninum* ocurrió en 1984 en una camada de perros Boxer en Noruega. Entre dos a seis meses después de su nacimiento, cinco de los seis animales desarrollaron desórdenes neurológicos. En el cerebro y en los músculos se encontraron quistes similares a los de *Toxoplasma gondii*, pero no existía seguridad de que realmente pertenecieran a esa especie (Bjerkas, Mohn y Presthus, 1984). El suero de estos animales carecía de anticuerpos anti-*T. gondii* y al inocular estos quistes en ratones la infección tampoco prosperó. Hasta 1988, ese parásito fue llamado "toxoplasma-like", año en el que Dubey et al. (1988) revisaron las muestras histológicas y los casos clínicos de veintitrés caninos que habían sido evaluados en el Angell Memorial Animal Hospital en Boston, Estados Unidos con

diagnósticos compatibles con toxoplasmosis (Beard, 2008). Del total de animales, *T. gondii* fue identificado en trece, pero en los diez restantes se observaron merontes en varios tejidos de un parásito desconocido, principalmente en cerebro y médula espinal, que a su vez presentaban lesiones de meningoencefalitis. El nuevo parásito fue denominado *Neospora caninum* (*Neospora* por nuevo esporozoa y *caninum* por el hospedador donde se encontró) y estaba localizado directamente en el citoplasma de las células hospedadoras sin estar rodeado por una vacuola parasitófora. La mayoría de los apicomplexas crecen y se replican dentro de esta vacuola, un compartimiento no-fagosomal unido a la membrana plasmática que es secretado desde muchas vías de tráfico celular (Morrisette y Sibley, 2002).

Posteriormente, Dubey y cols., (2002a) en una re-descripción de la especie aclaró que el parásito habitaba en el interior de la vacuola parasitófora pero que ésta era muy delgada y no se observaba en algunos ejemplares o que pudiera desintegrarse en los estadios tempranos de degeneración de la célula hospedadora. La clasificación de *N. caninum* como nueva especie fue también controversial debido a su similitud con *Haemmondia heydorni*, debido a que los ooquistes de ambas especies son morfológicamente indistinguibles (McAllister y cols., 1998). *Hammondia heydorni* es una coccidia cuyos hospedadores naturales son el bovino y el perro. Este último elimina con sus heces los ooquistes no esporulados luego de la ingestión de carne bovina naturalmente infectada. La polémica fue aclarada posteriormente (Dubey y cols., 2002b) con base en diferencias en ciclos de vidas, desarrollo en cultivos celulares, características ultraestructurales y moleculares.

4.1. Ciclo de vida de *N. caninum*.

Se han descrito dos modos diferentes de reproducción en el ciclo de vida de *N. caninum*: la reproducción sexual que tiene lugar únicamente en los cánidos, como el perro doméstico (McAllister y cols., 1998), coyote (Gondim y cols., 2004), lobo gris (Dubey y cols., 2011) y dingo (King y cols., 2010) y la reproducción asexual, que tiene lugar en hospedadores intermediarios como el bovino. Si se comparan los ciclos de vida de *N. caninum* y *T. gondii*, el primero es más

restringido en la distribución de los hospedadores, ya que *T. gondii* infecta un gran número de hospedadores mamíferos.

Existen tres estadios en el ciclo de vida de *N. caninum*. El ooquiste, originado de la fusión de dos gametos en el intestino del hospedador definitivo, tiene una fuerte pared exterior. Aunque no se conoce nada sobre las condiciones ambientales a las que sobrevive el ooquiste, se asume sean las mismas que prevalecen para *T. gondii*. Fuera del hospedador, de manera similar a las coccidias, los ooquistes esporulan para dar lugar a dos esporoquistes que contienen cuatro esporozoítos cada uno (Dubey y cols., 2002a) Estos ooquistes pueden ser ingeridos por animales, como los bovinos, al consumir pasto o agua contaminados e infectarse. Los esporozoítos son liberados en el intestino del hospedador, invaden la pared intestinal y se transforman en taquizoítos. Los taquizoítos residen en el interior de la vacuola parasitófora y se replican por un proceso asexual en el que dos células hijas se desarrollan en el interior de una célula parasitaria madre. Los taquizoítos pueden invadir e infectar diversos tipos de células hospedadoras en tejidos nerviosos, endoteliales, musculares y hepáticos (Dubey y cols., 1990; Dubey y cols., 2002a). Los taquizoítos son células de replicación rápida y pueden pasar por unos veinte ciclos de división antes de diferenciarse en bradizoítos, estadios de replicación asexual lenta que forman quistes en los tejidos. Los quistes se encuentran generalmente en el cerebro y la médula espinal o en músculo esquelético y pueden persistir por muchos años en estos tejidos sin que sucedan manifestaciones clínicas (Dubey y Lindsay, 1993).

El ciclo de vida se completa cuando los quistes que se encuentran en los tejidos son ingeridos por los caninos. Estos quistes pueden sobrevivir el paso por el estómago pero liberan luego los bradizoítos que infectan las células del intestino delgado. Aún no se han observado los estadios gametogónicos de *N. caninum* pero deben existir pues la formación de ooquistes ocurre para comenzar el ciclo nuevamente.

Todos los estadios de *N. caninum* están involucrados en la transmisión del parásito. Los carnívoros (hospedador definitivo) se infectan al ingerir los tejidos

que contienen los bradizoítos y los herbívoros (hospedadores intermediarios) se infectan al consumir alimento o agua contaminada con los ooquistes. La infección transplacentaria puede ocurrir cuyo los taquizoítos se transmiten de una madre infectada a su feto durante la preñez (Dubey, 2005). Sin embargo, el hecho de encontrar formas parasitarias o anticuerpos contra *N. caninum* no significa necesariamente que esa especie juegue un papel importante en el ciclo de vida. En este aspecto, *N. caninum* se diferencia de *Toxoplasma gondii* pues el rango de hospedadores es más restringido en el primero. Con la excepción de perros y caballos, todos los hospedadores intermediarios de *N. caninum* son miembros de la familia Bovidae (Donahoe y cols., 2015).

Hasta el momento, la infección no ha sido reportada en primates (primates), quirópteros (murciélagos), dermópteros (lémures), edentata, tubulidentata (cerdo hormiguero), hyracoidae (*Procavia capensis*), pholidata (pangolinos) y sirenia (manatíes). No existe evidencia tampoco de exposición o infección en especies ectotérmicas como reptiles, anfibios y peces (Donahoe y cols., 2015).

4.3. Aspectos epidemiológicos de la neosporosis.

La neosporosis ha sido observada en la mayor parte del mundo incluyendo América, Australia, Europa, Corea, Japón, Nueva Zelanda, Tailandia (Dubey, 2003). La seroprevalencia de neosporosis varía considerablemente entre los países, dentro de los países, entre las regiones e incluso entre las razas de bovinos (Goodswen y cols., 2013). Estos resultados no pueden ser comparables debido a las diversas prácticas de manejo, especies animales, técnicas de diagnóstico y condiciones ambientales, pero proveen evidencia de la existencia del parásito.

En una revisión muy extensa de la enfermedad, Dubey y cols. (2007) presentaron datos sobre seroprevalencia de *N. caninum* en caninos y ganado de diversas regiones del mundo. En caninos, las seroprevalencias observadas oscilan desde 0,2% en las Islas Farkland (Barber y cols., 1997) hasta 100% en una granja de ganado y ovejas en Nueva Zelanda (Antony y Williamson, 2003); en bovinos, se ha obtenido valores máximos de seroprevalencia de 64% en vacas lecheras con

abortos en Argentina (Venturini y cols., 1999) y, en bovinos de carne los mayores valores de seroprevalencia oscilan entre 20 a 30% en Estados Unidos, Paraguay, Argentina y Brasil (Syerson y cols., 2000; Osawa y cols., 2002; Moore, 2005; Melo y cols., 2006); sin embargo, un estudio reporta 79% en el estado de Nebraska en Estados Unidos (McAllister y cols., 2000). Reichel y cols. (2013) determinaron que el nivel de infección por *N. caninum* es generalmente 50% más alto en ganado lechero que en ganado de carne, determinando medias de seroprevalencia de 16,1% y 11,5%, respectivamente.

Factores de riesgo.

La presencia de hospedadores definitivos en la granja como perros y otros canidos es uno de los principales factores de riesgo descritos en varios estudios (Dubey y Schares, 2006; Panadero y cols., 2010). El hábito de los perros de alimentarse con los fetos abortados o la placenta de los partos y, posteriormente al contaminar con los ooquistes el alimento del ganado aumenta la probabilidad de infección postnatal en el rebaño (VanLeeuwen y cols., 2010; Dubey y Schares, 2011).

Otros factores tales como la inmunosupresión ocasionada por la presencia de micotoxinas en los alimentos o infecciones virales concomitantes, la raza, la edad de los animales y el número de gestaciones incrementan el riesgo de exposición a través del tiempo (Romero y cols., 2005; Bartels y cols., 2006; Dubey, Buxton y Wouda, 2006; Dubey y cols., 2007).

Se ha determinado la importancia de la transmisión horizontal de *N. caninum* en los rebaños, varios autores señalan que el riesgo de la seropositividad puede aumentar con la edad o el número de gestación del ganado bovino y lechero (Rinaldi y cols., 2005; Dubey y cols. 2007; Moore y cols., 2009; Klauck y cols., 2016).

Los rebaños destinados a la producción de leche presentan mayor probabilidad frente a los rebaños de producción de carne (Bartels y cols., 2006;

Almería y López-Gatius, 2013), resultados de algunos estudios sugieren que el sistema intensivo utilizado generalmente en este tipo de producción genera mayor probabilidad de transmisión (Moore y cols., 2002; Fort y cols., 2015). En ese sentido, Moore y cols. (2009) señalan que en los rebaños lecheros es más frecuente la exposición postnatal que en los rebaños bovinos de carne.

Con respecto a la raza, varios estudios reportan diferencias entre la susceptibilidad o resistencia del ganado nativo frente a otras razas. En España, el ganado de razas nativas que pastan en zonas altas con densidades de población muy bajas mostraron ser menos propensos a una infección por *N. caninum* frente a otras razas (Almería y López-Gatius, 2013); un resultado similar se determinó en un estudio realizado en iguales condiciones de manejo extensivo en bovinos de la raza Limousin frente a otras razas de doble propósito (Armengol y cols., 2007). Por otra parte, Bartels y cols. (2006) observaron que el ganado sueco rojo y blanco presentaba mayor probabilidad de infección a *N. caninum* comparado a otras razas.

Entre los factores de riesgo relacionados al manejo y a la estación se describen la densidad de animales durante el invierno, el uso de animales de la misma granja para reemplazo, la suplementación alimenticia, la presencia de animales de vida silvestre, entre otros. Ciertas condiciones del clima pueden favorecer una rápida esporulación y supervivencia del parásito. La contaminación con ooquistes del pasto, forraje y el agua de bebida son factores potenciales para la infección postnatal del ganado (Syerson y Baszler, 2000; Otranto y cols., 2003; Dubey y cols., 2007; Rodríguez y cols., 2016).

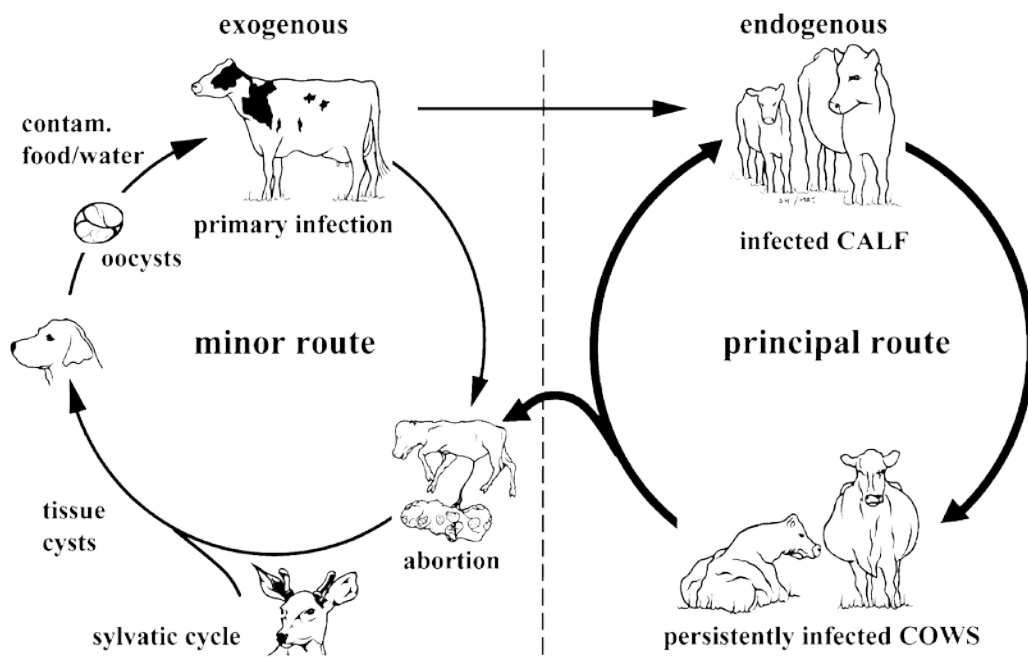
Transmisión.

En la transmisión de *N. caninum* se han descrito dos rutas de infección denominadas transmisión transplacentaria endógena y transmisión transplacentaria exógena precisamente para describir el origen y la vía de infección del feto. Estas rutas de infección son vitales inclusive para la supervivencia del parásito (Trees y Williams, 2005; Dubey y cols., 2006). *N. caninum* es uno de los organismos más eficientes en la transmisión por vía

transplacentaria en los bovinos (Dubey y cols., 2007). Aproximadamente el 95% de los terneros nacen infectados; aunque la mayoría de los terneros no presenta signos clínicos permanecerán infectados durante toda su vida (Almería y López-Gatius, 2013).

La transmisión exógena u horizontal inicia cuando el ganado ingiere los ooquistes y posteriormente pasan al feto (Dubey, Buxton y Wouda, 2006; Staubli y cols., 2006); mientras que la transmisión endógena o vertical se realiza desde la madre persistentemente infectada al feto (Figura 3). En varios estudios se indica que la transmisión endógena ocurre en el 81 a 90% de los casos (Wouda y cols., 2000) Esta ruta de transmisión es la más importante, los animales mantienen la infección en el rebaño debido a la transmisión vertical durante varias generaciones (Piergili Fioretti y cols., 2003; Staubli y cols., 2006; Almería y López-Gatius, 2013).

Figura 3. Transmisión de neosporosis bovina .



Fuente: Adaptado de Dubey y cols. 2006

En los toros, *N. caninum* puede ser eliminado a través del semen y el ADN del parásito también ha sido detectado ocasionalmente en muestras de semen congelado. Los toros son considerados hospedadores intermediarios, no obstante

es poco probable la ocurrencia de transmisión venérea, sin descartar que esta posibilidad debería ser investigada (Moore y cols., 2003, 2005; Caetano-da-Silva y cols., 2004).

4.4. Patología.

La patogénesis en la neosporosis bovina está determinada por factores dependientes de la relación hospedador-parásito incluyendo la virulencia del aislado. Este aspecto ha sido revisado recientemente debido a que existen variaciones en patogenicidad entre los aislados de *N caninum*. En las hembras gestantes los bradizoítos alojados en los quistes tisulares pueden reactivarse posiblemente por influencia hormonal e inmunológica con la consecuente parasitemia. Al originarse la parasitemia, independientemente de la vía de infección, ya sea por reactivación de quistes latentes o como resultado de una infección oral, los taquizoítos atraviesan por vía sanguínea la placenta produciendo necrosis e inflamación y acceden además a los tejidos fetales. El aborto es la principal manifestación clínica y generalmente la enfermedad cursa con baja morbilidad y mortalidad (Dubey y cols., 2003; Moore y cols., 2005; Dubey, Schares y Ortega-Mora, 2007; Dubey y Schares, 2011).

La mayoría de los fetos provenientes de madres seropositivas se infectan a través de la vía transplacentaria y la consecuencia de la infección depende de la etapa de la gestación y la edad del feto (Goodswen y cols., 2013). Se ha estimado que entre la infección fetal y el aborto transcurren de tres a cuatro semanas (Barr y cols., 1991; Moore y cols., 2005). Si la infección ocurre durante el primer trimestre de gestación, la supervivencia es improbable y sucede la momificación o reabsorción fetal debido a que los tejidos linfoides del feto aún están en desarrollo (Dubey y Schares, 2011). Las lesiones descritas en fetos radican principalmente en el sistema nervioso central, con encefalomiелitis y necrosis. En el segundo y tercer trimestre, aunque el feto es capaz de desarrollar una respuesta inmune, ésta parece ser insuficiente, pues el aborto es la secuela más común de la infección en la mitad de la gestación, particularmente entre el quinto y el séptimo mes (Reichel y cols., 2013). Si la infección sucede en el último trimestre de la gestación, cuyo la

inmunidad fetal está más desarrollada, el resultado más probable es el nacimiento de un becerro infectado pero clínicamente normal (Innes y cols., 2005).

En ocasiones se puede observar en los bovinos menores de dos meses de edad, signos clínicos de la infección generalmente asociados a signos neurológicos, bajo peso o imposibilidad para levantarse; las extremidades anteriores y/o posteriores pueden estar flexionadas o hiperextensas, presentar ataxia, pérdida de la propiocepción o presentar exoftalmia. Ocasionalmente se observan defectos de nacimiento como hidrocefalia y estrechamiento de la médula espinal (Dubey, 2003)

Respuesta inmune.

En la neosporosis bovina la respuesta inmune es aún desconocida con respecto a la respuesta generada por la ingestión de ooquistes o por la inoculación de taquizoítos inactivados o vivos. Inclusive se cree que existe diferencias entre la respuesta inmune ocasionada por la infección prenatal o postnatal; así como por la variación de antígenos en los estadios de taquizoítos o bradizoítos (Fuchs y cols., 1998; De Marez y cols., 1999; Williams y cols., 2003; Moore y cols., 2005).

La respuesta inmune humoral contra *N. caninum* depende de la vía de infección (exógena o endógena) pero es relevante la producción de IgG₂ en ambas vías (L. F. P. Gondim y cols., 2004; Staubli y cols., 2006). Sin embargo, la respuesta inmune contra el parásito es principalmente celular, de tipo Th-1, que guía a la producción de interleucina 12 (IL-12), interferón gamma y óxido nítrico. La IL-12 es la citosina clave que une a las respuestas innatas y específicas y es producida por las células presentadoras de antígeno durante la interacción patógeno-hospedador (Aliberti, 2005; Donahoe y cols., 2015; Mota y cols., 2016), por ello, el papel de los macrófagos es particularmente importante para reducir el parasitismo tisular y la supervivencia del hospedador (Donahoe y cols., 2015; Hecker y cols., 2015). El rol del óxido nítrico, metabolito originado a partir del nitrógeno y producido por macrófagos activados, cumple entre otras funciones la

inmunosupresión y la destrucción de los parásitos intracelulares (Moore y cols., 2005).

Existe una respuesta eficaz celular durante la transmisión horizontal, pero se ha demostrado que ésta no es capaz de prevenir la recrudescencia de la enfermedad durante la preñez. Aunque el sistema inmune de una vaca persistentemente infectada puede resistir un desafío infeccioso de una transmisión exógena mediante la ingestión de ooquistes (Yerson y cols., 1995; McAllister y cols., 2000; Dubey y Schares, 2006), no es capaz de prevenir la transmisión transplacentaria endógena y esto permite la aparición de nuevos casos de abortos durante toda su vida reproductiva (Williams y cols., 2009; Asmare y cols., 2013; Bruhn y cols., 2013). En definitiva se considera que los factores que influyen la infección fetal están relacionados al modo de infección de la madre, el momento de la gestación, la respuesta inmune materna y la respuesta inmune del feto (Innes y cols., 2002; Moore y cols., 2005).

Lesiones.

Se ha descrito a la neosporosis bovina como una enfermedad de la placenta y el feto; las lesiones y el aborto ocasionados son el resultado de la parasitemia materna producida, independiente de la vía de infección (Dubey y cols., 2007). Aunque la placenta no siempre está disponible se ha descrito la presencia de una placentitis no supurativa y necrosis observadas después de abortos sucedidos en etapas tempranas de la gestación (Ortega-Mora y cols., 2006).

En el feto, el daño celular con necrosis e inflamación es causado por los procesos de multiplicación mediante endodiogenia que se inician en las células fetales infectadas (Moore y cols., 2005); es así que en los fetos abortados, las lesiones características son áreas multifocales de necrosis rodeadas de células inflamatorias que se presentan generalmente en el cerebro, médula espinal, corazón, hígado, riñón, pulmón y músculos (Barr y cols., 1991; Yerson y cols., 2011). Con mayor frecuencia se observan encefalitis, miocarditis (Ortega-Mora y cols., 2006; Almería y López-Gatius, 2015) y miositis multifocal no supurativa; así

como hepatitis con necrosis hepática variable (Dubey, 2003; Dubey y Schares, 2006; Donahoe y cols., 2015).

Por otra parte, lesiones como anomalía congénita ocular, ausencia casi total de los hemisferios cerebrales y deshidratación aséptica o momificación también se han encontrado en fetos naturalmente infectados (Campero y cols., 1998; Moore, 2005; Dubey, Buxton y Wouda, 2006).

4.5. Diagnóstico.

En la evaluación y confirmación del parasitismo por *N. caninum* se han empleado diversas técnicas como cultivos celulares, infección en modelos animales, identificación de ooquistes en heces, técnicas serológicas y de biología molecular. Se han obtenidos aislados viables de animales clínicamente enfermos y de neonatos de bovino (Yamane y cols., 1997; Locatelli-Dittrich y cols., 2003; Canada y cols., 2004), entre otros, ovinos (Koyama y cols., 2001), caninos (Gondim y cols., 2001), venado de cola blanca (Vianna y cols., 2005) y búfalos de agua (Rodrigues y cols., 2004). Aunque también se puede obtener *N. caninum* de cultivos celulares y a través de animales inmunosuprimidos, como ratones, gerbils y caninos, el aislamiento no es siempre fácil porque no todos los aislados crecen en cultivo (Vianna y cols., 2005) y sólo los ratones consanguíneos inmunosuprimidos son útiles para propagación del parásito. Se ha encontrado *N. caninum* en cortes histológicos de un rinoceronte (Williams y cols., 2002) y en caprinos (Eleni y cols., 2004), así como ADN en algunos animales, pero estos hallazgos no han conducido al aislamiento de parásitos viables para cultivo. El hallazgo de ooquistes (que deben ser identificados como *N. caninum*) en heces de caninos alimentados con tejidos infectados tiene la ventaja que pueden ser desarrollados en cultivos celulares o roedores (Dubey y cols., 2007).

Diagnóstico serológico.

En la actualidad la mejor opción para el diagnóstico de neosporosis bovina se basa en la detección de anticuerpos circulantes específicos contra *N. caninum* en

el suero o leche (González-Warleta y cols., 2011; Almería y López-Gatius, 2013). Al respecto existen varias técnicas o ensayos que se utilizan para determinar los títulos de anticuerpos maternos en los casos de aborto o para el diagnóstico serológico a nivel de rebaño. Entre estas pruebas tenemos el ensayo de Inmunofluorescencia indirecto (IFAT), el test de aglutinación de *Neospora* (NAT), Inmunoblot y el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Dubey y Schares, 2006, 2011; Wapenaar y cols., 2007; Almería y López-Gatius, 2015). Estos ensayos se basan en antígenos de taquizoítos (Dubey y Schares, 2006).

ELISA es el ensayo más utilizado especialmente para el diagnóstico a nivel de rebaño. Existen varias pruebas comerciales que se desarrollan en muestras de suero, plasma o leche (Almería y López-Gatius, 2015). Actualmente los ensayos de ELISA disponibles utilizan extractos o taquizoítos enteros o fijos e inclusive antígenos nativos únicos. Existen varios estudios realizados con antígenos recombinantes; aunque con un gran potencial para el diagnóstico, la purificación insuficiente de un antígeno recombinante derivó en reacciones falsas positivas (Jenkins y cols., 2005) . El uso de anticuerpos monoclonales y policlonales ha permitido desarrollar un ensayo de competición o inhibición competitiva (CI-ELISA) que permite detectar anticuerpos contra epítomos específicos de *N. caninum* (Dubey y Schares, 2006).

IFAT y NAT detectan anticuerpos frente a los antígenos de superficie del taquizoíto que son específicos de *N. caninum*; esta especificidad a la especie se ha demostrado en varios ensayos de anticuerpos monoclonales desarrollados contra los antígenos de la membrana externa de los taquizoítos (Dubey y Schares, 2006). Por otra parte, ensayos realizados en fluidos fetales determinaron mayor sensibilidad de la prueba de Inmunoblot frente a la prueba de IFAT (Staubli y cols., 2006).

Detección de N. caninum.

Un diagnóstico confirmatorio de infección por *N. caninum* se lo puede realizar a través de la detección histológica de las lesiones por inmunohistoquímica o la detección del parásito por PCR en muestras de cerebro, corazón o hígado de los fetos abortados (Lindsay y Dubey, 1989; Baszler y cols., 2001; Ortega-Mora, Fernández-García y Gómez-Bautista, 2006; Almería y López-Gatius, 2013, 2015). Dada la baja sensibilidad de la tinción inmunohistoquímica, la técnica de PCR puede ser de mayor utilidad, sin embargo se debe considerar que la presencia del DNA en el feto no determina que la causa del aborto sea *N. caninum*; se debe analizar paralelamente la información epidemiológica del rebaño (Almería y López-Gatius, 2013).

4.6. Lucha.

En todo el mundo la neosporosis bovina ocasiona grandes pérdidas reproductivas y productivas con un grave impacto económico en la economía de pequeños y grandes ganaderos; sin embargo hasta la actualidad no existe un tratamiento o inmunógeno capaz de prevenir la infección (Moore y cols., 2005).

Se han discutido numerosas medidas de control para reducir la infección por *N. caninum* en el ganado, incluyendo transferencia de embriones, inseminación artificial de madres seropositivas con semen de toros de carne, reemplazo, quimioterapia y vacunación (Dubey t cols., 2007). Algunos autores demostraron que la probabilidad de abortos era significativamente menor si las vacas lecheras eran inseminadas con semen de razas cárnicas, pero se sugirió que probablemente era un efecto favorable de este cruzamiento sobre la placenta (Almería y cols., 2009b; Yaniz y cols., 2010). La transferencia de embriones de hembras infectadas en receptoras no infectadas puede prevenir la transmisión transplacentaria endógena y permite la recuperación de material genético de gran valor (Paz y cols., 2007; de Oliveira y cols., 2010). Moore (2005) y (Campero y cols., 2003) han mencionado las ventajas de la transferencia de embriones en granjas con infecciones endémicas de *N. caninum*. No obstante, con el fin de controlar la

enfermedad se requieren con urgencia regulaciones establecidas por los organismos oficiales para la aplicación por parte de veterinarios y ganaderos. Aunque la enfermedad tiene una distribución mundial es necesario el control a nivel del comercio internacional para evitar que animales infectados introduzcan el parásito en rebaños nativos o en regiones donde la prevalencia de la enfermedad es baja.

Hasta el momento no se ha demostrado que existan tratamientos o vacunas efectivas contra neosporosis bovina. Por tanto, las estrategias para controlar la transmisión transplacentaria incluyen una combinación de:

- a) diagnóstico y eliminación de madres seropositivas
- b) diagnóstico e inseminación de la progenie de madres seropositivas solo con semen de razas cárnicas y,
- c) diagnóstico y exclusión de la progenie de madres seropositivas de los programas de crianza de la granja (Hall, Reichel y Ellis, 2005; Lopez-Gatius y cols., 2005; González-Warleta y cols., 2011).

Existe una vacuna muerta derivada de taquizoítos en cultivo celular con adyuvante, disponible comercialmente y aplicada en Estados Unidos (Estill, 2004), Costa Rica (Romero y cols., 2004) y Nueva Zelanda (Heuer y cols., 2003). Por otra parte, existe una vacuna no comercial derivada asimismo de taquizoítos de cultivo y utilizada experimentalmente en Argentina (Moore y cols., 2005). Sin embargo, los animales inoculados con estas vacunas desarrollaron respuesta de anticuerpos de manera similar a los animales con infección natural (Choromanski y Block, 2000; Yrianarivo y cols., 2001; Moore y cols., 2005; Dubey y Schares, 2006). Esta respuesta representa un inconveniente no solo para el diagnóstico sino también en la eliminación de animales seropositivos como medida de control de la enfermedad (Moore y cols., 2005).

El tratamiento de neosporosis en el ganado no es económicamente factible. Sólo puede ser usado como medida de prevención y su aplicación se realizaría por largos períodos de tiempo; de esta manera el producto final, la carne y leche, no es

aceptable para el consumo humano por las regulaciones sanitarias. Hasta el momento no existe quimioterapia segura y efectiva para la neosporosis bovina, aunque algunos estudios sobre el efecto del tortazuril y su derivativo ponazuril han demostrado algún efecto *in vivo* e *in vitro* sobre taquizoítos de *N. caninum*. En terneros inoculados experimentalmente y tratados con ponazuril, el parásito fue eliminado del cerebro y otros órganos logrando además disminuir las lesiones cerebrales (Moore y cols., 2005; Dubey y Schares, 2011).

Una estrategia general para controlar la neosporosis debe basarse en las características regionales de la epidemiología de la enfermedad. Varios autores sugieren la necesidad de incorporar en los planes de control, el cálculo de costo beneficio de los gastos generados por pruebas y las acciones de control, comparado con el beneficio de la reducción de pérdidas económicas generadas por la infección o los abortos (Larson y cols., 2004; Bartels y cols., 2006; Dubey y cols., 2007; Reichel y cols., 2013).

III OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de la investigación descrita en esta tesis, es contribuir al conocimiento actual de la epidemiología de enfermedades que ocasionan alteraciones reproductivas en el ganado bovino de Ecuador. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

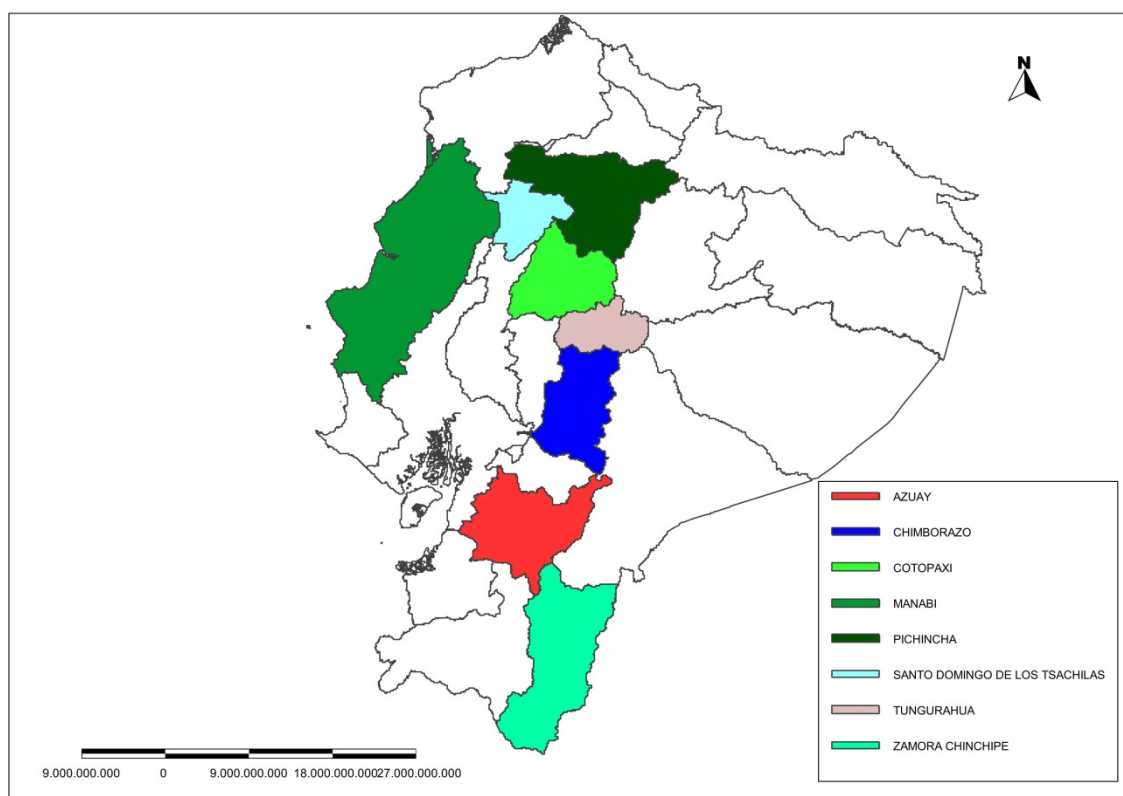
1. Calcular la prevalencia de, *Brucella* spp., *Leptospira interrogans* serovar Hardjo y *Neospora caninum* en rebaños de aptitud lechera y de doble propósito de Ecuador.
2. Determinar los factores de riesgo de las infecciones previamente mencionadas.
3. Comprobar la existencia de *Coxiella burnetii* en ganado bovino ecuatoriano.
4. Determinar, en caso de que se halle, los factores de riesgo asociados a la infección por *C. burnetii*.
5. Evidenciar la existencia de asociaciones entre los distintos agentes reproductivos estudiados.
6. Establecer un plan de lucha general a partir de los factores de riesgo que permita disminuir la prevalencia de los agentes reproductivos estudiados en explotaciones bovinas lecheras y de doble propósito de Ecuador.

IV MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población en estudio.

El estudio se realizó en explotaciones bovinas de aptitud láctea y de doble propósito ubicadas en ocho provincias de Ecuador (ver Figura MM1): Azuay, Chimborazo, Cotopaxi, Manabí, Pichincha, Sto. Domingo de los Tsáchilas, Tungurahua y Zamora Chinchipe. Estas provincias incluyen al 62 por ciento de los colectivos (Unidades de Producción Agropecuaria (UPA's)) del país, con una producción láctea superior al 72 por ciento del total nacional (INEC, 2013).

Figura MM1: Ubicación de las provincias en las cuales se realizó el muestreo.



Debido a la falta de un sistema de identificación de las explotaciones y del ganado bovino en Ecuador, el muestreo se desarrolló en tres etapas (Saa, 2009): la primera, mediante muestreo estratificado por provincias, con objeto de que la muestra obtenida por provincia sea proporcional al censo en dicha provincia. En una segunda etapa, y tomando en cuenta las coordenadas UTM (Universal

Transverse Mercator), se realizó un muestreo por conglomerados dentro de cada provincia; cada conglomerado tiene una extensión de 25 Km² y fueron enumerados y elegidos al azar mediante la función RANDOM en Excel, de tal manera que en cada conglomerado se recogieron muestras del 100 por cien de las explotaciones incluidas en el mismo. Finalmente, en cada explotación se eligió los individuos mediante muestreo aleatorio simple, incluyendo todos los animales mayores de seis meses (Thrusfield, 2007). El muestreo se llevó a cabo entre 2008 y 2010.

La ubicación de las explotaciones dentro de las provincias ecuatorianas en las que se realizó el muestreo se observa en la Figura MM1.

2 Determinación del tamaño de la muestra.

El tamaño de la muestra se determinó mediante el programa informático de Epidemiología Veterinaria WinEpiscopo 2.0, de libre difusión y desarrollado por el gobierno de Aragón en colaboración con la Universidad de Zaragoza, la Universidad de Wageningen y la Universidad de Edimburgo.

De acuerdo al último Censo Nacional Agropecuario (INEC-MAG-SICA), realizado en el año 2000, el número de unidades bovinas fue de 4.486.020; las Unidades de Producción Agropecuaria (explotaciones) fueron 806.856, con una producción de 3.525.026 litros de leche a nivel nacional.

En Ecuador no existen estudios previos de prevalencia de los agentes causantes de enfermedades reproductivas incluidos en esta tesis (*Neospora caninum*, *Brucella* spp., *Coxiella burnetii* y *Leptospira* spp.). En consecuencia, al igual que en la metodología descrita por Saa (2009) para determinar el número de muestras y de explotaciones, se utilizaron los siguientes valores: una prevalencia esperada del 50 por ciento con nivel de confianza del 95 por ciento y un error del 5 por ciento, resultando un tamaño de muestra de 384 explotaciones. El muestreo se realizó en 386 explotaciones. Se tomaron de ocho a once muestras de sangre en cada explotación en base a una prevalencia entre el 25 y el 35% de *C. burnetii* y *Brucella* (estudios preliminares) y un tamaño del rebaño de 1000 (valor superior al tamaño del mayor rebaño muestreado en Ecuador), obteniéndose un total de

muestras de suero obtenido de 2.668 (Tabla MM1). El tamaño de muestra para detectar la enfermedad en cada rebaño fue calculado con el programa WinEpiscope 2.0.

Tabla MM1: Número de explotaciones y muestras por cantones y provincias.

Provincia	Cantones	Explotaciones	Muestras
Azuay	Sig-Sig	7	35
	Cuenca	46	334
	Girón	5	33
	TOTAL	58	402
Chimborazo	Riobamba	3	20
	Chambo	6	46
	Penipe	6	36
	Guamote	4	25
	Pallatanga	4	27
	Chunchi	21	67
	TOTAL	44	221
Tungurahua	Ambato	17	98
	Píllaro	4	24
	Salcedo	3	19
	Quero	6	31
	Pelileo	3	18
	TOTAL	33	190
Cotopaxi	Sigchos	4	32
	Latacunga	22	176
	La Maná	9	51
	TOTAL	35	259
Pichincha	Quito	31	227
	Mejía	7	44
	Cayambe	11	82
	San Miguel de los Bancos	2	13
	Pedro Moncayo	3	16
	TOTAL	54	382
Santo Domingo de los Tsáchilas	Sto. Domingo	35	261
	TOTAL	35	261
Manabí	El Carmen	39	305
	Flavio Alfaro	1	8
	Jama	24	186
	Junín	1	8
	Pedernales	15	117
	Sucre	2	16
	Chone	21	155
	Bolívar	3	19
	TOTAL	106	814
Zamora Chinchipe	Yantzaza	9	53
	Centinela del Cóndor	11	81
	Zumbi	1	5
	TOTAL	21	139
TOTAL		386	2668

Durante el muestreo se llevaron a cabo dos actividades: 1) obtención de muestras de sangre de los bovinos para determinar la prevalencia de infección de los agentes descritos y, 2) cumplimentación de una encuesta epidemiológica que incluía las variables potencialmente asociadas con la seropositividad frente a cada uno de los agentes.

3. Diseño del cuestionario epidemiológico y obtención de los datos.

El diseño de la encuesta se basó en estudios similares publicados, visitas a diferentes explotaciones para conocer el sistema de manejo e identificar las posibles variables que podrían tener un efecto (Saa, 2009) y consulta a ganaderos y veterinarios de la zona de estudio para su validación. Finalmente se diseñaron dos cuestionarios que se describen a continuación:

1. *Cuestionario por explotación.* Se incluyen datos relacionados con las características generales de la explotación: ubicación, extensión, aptitud, instalaciones, composición del rebaño; variables asociadas al contagio o introducción de agentes infecciosos, así como otras variables relativas al manejo, alimentación, manejo reproductivo y sanidad de la explotación. En la tabla MM2 se observa el modelo de la encuesta epidemiológica que se aplicó.

2. *Cuestionario por individuos.* En esta ficha se incluyó la edad, el sexo y la raza de cada uno de los animales muestreados, dejándose un espacio para observaciones adicionales. El modelo de esta ficha se adjunta en la tabla MM3.

La fiabilidad del cuestionario se estableció mediante entrevista en 25 granjas no incluidas en este estudio y la repetición del cuestionario en las mismas granjas tras de un mes como control para validar la encuesta. El valor de fiabilidad obtenido (número total de preguntas con la misma respuesta en las dos consultas / número total de preguntas en el cuestionario) fue del 87 %.

En Ecuador no se ha desarrollado aún una normativa estatal que regule la obtención de permisos de investigación en animales. En consecuencia, se solicitó y se obtuvo la autorización para la realización de este estudio al organismo nacional

encargado de la ejecución de políticas y planes en agricultura y ganadería (Ministerio de Agricultura Acuicultura y Pesca – MAGAP). En cada una de las explotaciones se informó a los ganaderos de forma detallada de los objetivos del estudio y se solicitó su consentimiento para participar en el mismo. Tras obtener su aprobación, se procedió a realizar las encuestas y la toma de muestras de sangre.

Para el trabajo de campo se capacitó a un grupo de seis estudiantes de pregrado de Ingeniería Agropecuaria de la Universidad Técnica particular de Loja (UTPL), que actuaron como ayudantes de campo y colaboraron tanto en las entrevistas como en la obtención de muestras. Las encuestas se cumplieron mediante entrevista al propietario y/o a la persona o personas encargadas del cuidado de los animales. En muchos casos no se pudo determinar el porcentaje exacto de mortalidad de terneros y adultos, diarreas y abortos ya que solamente en 15 haciendas del total de las encuestadas se llevaban registros de producción, siendo el resto de los datos referenciales.

Con respecto a las prácticas de vacunación, muchos de los ganaderos y encargados de las unidades de producción confunden el término vacunar con la acción de desparasitar o aplicar cualquier medicamento a los animales por vía parenteral. Para establecer la veracidad de la vacunación a las enfermedades en estudio, se solicitó a cada ganadero el nombre del producto o una muestra del envase que utilizaba en la práctica que él definía como vacunación.

Tabla MM2: Cuestionario epidemiológico por explotación.

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA

CARACTERÍSTICAS DE LA GRANJA

1. ID (Número de encuesta): _____ 2. Propietario: _____
3. Teléfono: _____ 4. Fecha de visita: _____
5. Localidad: _____ 6. Cantón: _____ 7. Provincia: _____
8. Coordenadas UTM: _____ N _____ S 9. Altitud: _____
10. Antigüedad de la explotación (años): _____
11. Aptitud de la granja: 1. Lechera _____ 2. Aptitud mixta _____
12. Raza: 1. Criollo _____ 2. Mestizo _____ 3. Holstein _____
13. Tamaño útil (Ha): _____ 14. Tamaño de granja (Ha): _____
15. Número total de animales : _____ 16. Número de terneros: _____
17. Número de hembras en producción: _____
18. Edad del desvieje: _____ 19. Porcentaje desvieje: _____ 20. Porcentaje reposición: _____
21. Pendiente (%): _____

INSTALACIONES

22. Instalaciones: _____ 23. Ventilación: 1. Buena _____ 2. Mala _____
24. Limpieza: 1. Buena _____ 2. Mala _____
25. Sala de ordeño: SI NO 26. Manga de manejo: SI NO 27. Establos: SI NO
28. Tipo de cama: _____ 29. Cercas: SI NO 30. División de pastos: SI NO
31. Pediluvios: SI NO

VARIABLES RELACIONADAS CON CONTAGIO/INTRODUCCIÓN

32. Distancia a granja más cercana (con vacas) (m): _____ 33. Explotación bovina colindante (m): _____
34. Densidad explotaciones ganaderas en zona: _____
35. Asistencia a ferias ganaderas: SI NO 36. Vuelven los animales a la granja : SI NO
37. Cada que tiempo van a las ferias ganaderas (semanas): _____
38. Visitas a la granja: 1 Técnicos IA _____ 2. Veterinarios _____ 3. Otros _____
39. Se mezclan rebaños distintos (entre granjas): SI NO
40. Presencia de ovejas y/o cabras: SI NO
41. Presencia de rumiantes salvajes: SI NO
42. Reposición de los animales: Propia _____ Externa _____

ALIMENTACIÓN

43. Vigilancia toma de calostro: SI NO 44. Edad destete (meses): _____
45. Leche o sustituto: _____ 46. Uso de leche mamitis: SI NO
47. Número de tomas: _____ 48. Origen del agua: 1 Pozo _____ 2. Río/arroyo _____ 3. Potable _____
49. Empleo de pienso: SI NO 50. Origen del pienso: _____
51. Pastoreo: SI NO 52. Suplementación de alimentación: _____
53. Otros alimentos: _____

.../...

Tabla MM2 (Continuación)

REPRODUCCIÓN

54. Tipo de reproducción: 1. Monta dirigida _____ 2. IA _____ 3. Monta libre _____
55. Sincronización de partos: SI NO

SANIDAD

56. Vacuna IBR madres: SI NO 57. Vacuna DVB madres SI NO 58. Vacuna Brucelosis: SI NO
59. Vacuna Clostridial: SI NO 60. Vacunación terneros: SI NO 61. ¿De qué?: _____
62. Revacunación: SI NO 63. ¿De qué?: _____
64. Desinfección cordón umbilical: SI NO
65. Desparasitación adultos: SI NO 66. Desparasitación terneros: SI NO
67. Mortalidad media anual terneros: _____ 68. Mortalidad media anual adultos: _____
69. Cuarentena: SI NO
70. Porcentaje de diarreas (actual): _____ 71. Porcentaje de abortos (actual): _____
72. Observaciones: _____

Tabla MM3: Cuestionario individual.

Explotación		Fecha de muestreo		Provincia	Cantón Localidad
Número de Muestra (Cod.)	Edad	Raza	Sexo	Sistema de Explotación	Observaciones

4. Obtención y procesado de las muestras de sangre.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante venopunción en la base de la cola, empleando tubos Vacutainer® (Becton-Dickinson, UK) de 10 ml previamente rotulados con la correspondiente identificación de la muestra. Posteriormente, fueron transportadas bajo refrigeración (-4 °C) a las instalaciones del Laboratorio de Sanidad Animal y Zoonosis de la UTPL. Las muestras de sangre se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10-15 minutos; a continuación, el suero fue dispensado en alícuotas en microviales (tubos de reacción) rotulados con una clave numérica y, posteriormente, almacenados a -25 °C hasta el momento de su análisis.

5. Análisis serológicos.

El análisis serológico para cada uno de los agentes del estudio se realizó mediante pruebas comerciales de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas o ELISA (acrónimo del inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay); técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se combina con el correspondiente anticuerpo si está presente en el suero y que está ligado a una enzima capaz de generar un producto detectable. A continuación, se describen en los siguientes apartados los protocolos realizados para cada uno de los agentes estudiados.

5.1. *Brucella* spp.

La determinación de niveles de anticuerpos séricos por ELISA se realizó utilizando el kit INGEZIM BRUCCELLA COMPAC 2.0, multiespecie (10.BRU.K3) de la empresa INGENASA, diseñado para detectar anticuerpos específicos frente a lipopolisacáridos (LPS) de *Brucella* mediante el ensayo inmunoenzimático de bloqueo; este kit es capaz de detectar niveles bajos de anticuerpos en sueros de distintas especies animales infectadas (bovino, ovino, caprino, cerdo, etc.).

La base de las placas está recubierta con LPS purificado de *Brucella abortus*. Después de adicionar las muestras de suero a la placa, si contiene anticuerpos

específicos contra *Brucella*, estos se unen al antígeno. Mediante lavados se elimina el material no unido y se añade un anticuerpo monoclonal específico (conjugado con peroxidasa) contra el antígeno LPS (epítipo C); si las muestras contienen anticuerpos frente al LPS, estos no permitirán la unión del conjugado (Mab-anticuerpo monoclonal marcado). En contraste, si las muestras no contienen este tipo de anticuerpos, el conjugado se unirá libremente al antígeno de la placa.

Tras lavar la placa para eliminar todo el material no fijado, se puede detectar la presencia o ausencia del anticuerpo monoclonal marcado mediante la adición del sustrato TMB (describir) que en presencia de la peroxidasa desarrollará una reacción colorimétrica; así, la aparición de una reacción coloreada, indicará que la muestra analizada no contenía anticuerpos específicos del LPS de *Brucella* spp. y la ausencia de color indicará que la muestra contiene dichos anticuerpos por lo tanto es positiva.

Todos los componentes del kit se almacenaron en refrigeración (+4 °C); siguiendo las instrucciones del fabricante, antes de empezar cada ensayo, todos los componentes del kit se equilibraron a temperatura ambiente, se prepararon las muestras y la solución de lavado. Previo a iniciar el protocolo se procedió como sigue:

- a. Preparación de las muestras: Dilución 1/10 (90 μ l de diluyente y μ l de suero). Se agitó suavemente para una correcta homogenización de la mezcla.
- b. Preparación de la solución de lavado: Dilución de 40 ml de solución concentrada más 960 ml de agua destilada.

Procedimiento: Se aplicó el protocolo establecido en el kit de la siguiente manera:

1. Añadir en cada pocillo 100 μ l de los sueros diluidos, luego se añaden 100 μ l de los controles positivo y negativo.
2. Incubar durante una hora a temperatura ambiente (20-25 °C).

3. Lavar cuatro veces. El volumen de líquido de lavado en cada ciclo es de 300 μ l en cada pocillo. Las placas se agitan ligeramente antes de eliminar su contenido y se inicia un nuevo ciclo. En todos los casos se utilizó un lavador automático de placas.
4. Añadir 100 μ l de conjugado a cada pocillo, tapar la placa.
5. Incubar una hora a temperatura ambiente.
6. Lavar cuatro veces la placa según el procedimiento descrito anteriormente.
7. Añadir a cada pocillo 100 μ l de sustrato.
8. Incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se contabilizó el tiempo a partir de la adición de la solución al primer pocillo.
9. Añadir 100 μ l de solución de frenado a cada pocillo. La solución de frenado se dispensó en el mismo orden en que se añadió el sustrato.
10. Leer los valores de OD₄₅₀ (absorbancia a 450 nm). Se utilizó un espectrofotómetro Lector Tekan Modelo Sunrise.

Validación de la prueba.

Para la validación de la prueba se calculó la media aritmética de los valores obtenidos en los dos pocillos para el control positivo y para el control negativo; luego:

- El valor de absorbancia (OD₄₅₀) del control negativo (CN) debe ser mayor de 1.
- El valor de absorbancia (OD₄₅₀) del control positivo (CP) debe ser menor de 0.35.

Interpretación de los resultados.

Se calculó el porcentaje de inhibición (PI) de cada muestra según la siguiente fórmula:

$$PI = 100 \times [1 - (OD \text{ muestra}/OD \text{ control negativo})]$$

- Muestras con PI > 40 % se consideraron positivas para anticuerpos específicos de *Brucella*.
- Muestras con PI < 40 % se consideraron negativas para anticuerpos específicos de *Brucella*.

La sensibilidad del kit es de 98.00 % y especificidad de 99.90 %.

5.2. *Coxiella burnetii*.

Para la determinación de anticuerpos frente a este agente se empleó el kit comercial IDEXX Q Fever©, un inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos contra antígenos de la fase I y II a partir de la cepa Nine Mile de *C. burnetii* en muestras de suero, plasma y leche de rumiantes.

a. Preparación de los reactivos

Solución de lavado: Dilución 1:10 de la solución del lavado concentrada 10 × con agua destilada/desionizada. La proporción utilizada fue 270 mL de agua destilada por cada 30 mL de solución de lavado.

b. Preparación de las muestras: Dilución de las muestras de suero y los controles Positivo y Negativo 1:400 en un tubo, utilizando la solución de lavado. La proporción utilizada fue 798 µl de solución de lavado, por cada 2µl de muestra de suero bovino.

Procedimiento

1. Dispensar 100µl de las muestras y los controles previamente diluidos en los pocillos. Tapar la placa.

2. Incubar durante 60 minutos (+ 5 min.) a 37 °C (\pm 3 °C).
3. Lavar tres veces con solución de lavado; en cada lavado se utiliza 300 μ l por pocillo.
4. Dispensar 100 μ l de conjugado en cada pocillo, cubrir la placa.
5. Incubar la placa durante 60 minutos (\pm 5 min.) a 37 °C (\pm 3 °C).
6. Lavar tres veces.
7. Dispensar 100 μ l de sustrato TMB en cada pocillo.
8. Incubar a 18 - 26°C por 15 minutos (\pm 1 min.).
9. Añadir a cada pocillo 100 μ l de la solución de frenado. La solución de frenado debe aplicarse en el mismo orden que el sustrato.
10. Leer los resultados con un espectrofotómetro a 450 nm. Las placas deben ser leídas dentro de un período máximo de dos horas tras añadir la solución de frenado.

Para la validación de la placa, la densidad óptica del Control Positivo (CP A₄₅₀), no debería ser superior a 2.000 y la densidad óptica del Control Negativo (CN A₄₅₀) no debería exceder de 0.500.

La diferencia de la densidad óptica entre el Control Positivo y el Control Negativo (CP A₄₅₀ - CN A₄₅₀) debe ser \geq 0,300.

Cálculo de la Densidad óptica

- La densidad óptica del control positivo (CP_x) así como la densidad óptica de las muestras (Muestra A₄₅₀) se corrigió restándoles el valor de la densidad óptica del Control Negativo (CN_x).
- DO corregida del Control Positivo: CP_x - CN_x
- DO corregida de la muestra: Muestra A₄₅₀ - CN_x
- El valor de cada muestra se calculó con relación al control negativo (CN) y control positivo (CP) con la siguiente fórmula:

$$M/P\% = 100 \times (Muestra A_{450} - CN_x / CP_x - CN_x)$$

Interpretación de resultados

- Una muestra fue clasificada como positiva cuando el porcentaje de positividad fue $\geq 40\%$
- Valores de $\geq 30\%$ a $> 40\%$ dudoso
- Valores $>30\%$ negativo

De acuerdo al fabricante del kit los parámetros de validez interna de esta técnica son 100.00 % de sensibilidad y 97.80 % de especificidad.

5.3. *Leptospira interrogans* serovar Hardjo.

El kit utilizado para determinar anticuerpos contra *L. interrogans* serovar hardjo fue PrioCHECK® L. hardjo Ab de la empresa Prionics AG Versión 1.0_es.

El ensayo es un ELISA indirecto. Las muestras de suero se agregan a los pocillos de una placa de poliestireno recubierta con antígeno inactivado. Los anticuerpos dirigidos contra *L. interrogans* serovar Hardjo presentes en las muestras se unen al antígeno durante la incubación, y se detectan con anticuerpo anti-bovino conjugado con peroxidasa. Para visualizar el conjugado unido se incuban las muestras con la solución de sustrato cromógeno (TMB). Luego de la incubación, se detiene el desarrollo de color. Finalmente, el color se mide a una longitud de onda de 450 nm.

A continuación se describe el protocolo sugerido por el fabricante del kit:

a. Preparación de los reactivos

Solución de trabajo del tampón de dilución (5X): Diluir 5 veces el tampón de dilución concentrado en agua desmineralizada. (1 volumen de tampón concentrado + 4 volúmenes de agua desmineralizada).

Suero equino (liofilizado). Equilibrar el vial a $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ y reconstituir el suero equino con 3.5 mL de agua desmineralizada.

Tampón de ELISA: Agregar suero equino reconstituido a la solución de trabajo del tampón de dilución hasta lograr una concentración final del 1/100 (v/v). Por cada placa de ensayo se preparó 40 mL (400 μL de suero equino reconstituido + 39,6 ml de solución de trabajo del tampón de dilución).

Dilución del conjugado: Diluir el conjugado ($30\times$) 1/30 en la solución de trabajo del tampón de dilución. Para cada placa de ensayo se preparó 12 ml (400 μL de conjugado + 11.60 ml de solución de trabajo del tampón de dilución).

Sueros de referencia: Reconstituir los sueros con 0.5 ml de agua desmineralizada. Por indicaciones del fabricante, los sueros reconstituidos fueron alicuotados y almacenados a -20°C . Una vez descongelados los sueros, se mezcló con cuidado sin volverlos a congelar. Solución de lavado: Diluir el líquido de lavado concentrado ($200\times$) en agua desmineralizada. La cantidad de líquido de lavado concentrado fue suficiente para preparar un volumen final de 12 litros.

b. Preparación de los sueros de referencia y de los sueros analizados. Se diluyó 1:20 los sueros de referencia 1, 2 y 3 y los sueros del ensayo en una placa sin recubrir. Para ello se mezcló 10 μL de suero con 190 μL de tampón de ELISA.

Procedimiento

1. Agregar 100 μL de tampón de ELISA a los pocillos A1 y B1 de la placa de ensayo (= blanco)
2. Agregar 90 μL de tampón de ELISA a los pocillos C1 y H1

3. Agregar 10 μl 1:20 de referencia 1 diluida (= control positivo) a los pocillos C1 y D1. La dilución final fue 1:200
4. Agregar 10 μl de referencia 2 diluida 1:20 (= control negativo) a los pocillos E1 y F1. La dilución final fue 1:200
5. Agregar 10 μl de referencia 3 diluida 1:20 (= control positivo débil) a los pocillos G1 y H1. La dilución final fue 1:200
6. Agregar 90 μl de tampón de ELISA al resto de pocillos. Agregar 10 μl de los sueros del ensayo diluidos 1:20 a cada uno de estos pocillos. La dilución final fue 1:200. Tapar la placa, agitar suavemente.
7. Incubar la placa 60 ± 5 minutos a 37 ± 1 °C
8. Lavar la placa 6 veces con la solución de lavado.
9. Agregar 100 μl de conjugado diluido a todos los pocillos.
10. Tapar e incubar la placa 60 ± 5 minutos a 37 ± 1 °C.
11. Lavar la placa 6 veces con solución de lavado.
12. Agregar 100 μl de sustrato cromógeno (TMB) a todos los pocillos
13. Incubar la placa 15 minutos a 22 ± 3 °C.
14. Agregar 100 μl de solución de frenado. Por indicaciones del fabricante la solución de frenado se agregó 15 minutos después de haber llenado el primer pocillo con sustrato cromógeno, en el mismo orden y al mismo ritmo.

La medición de la densidad óptica (DO) de los pocillos se realizó a 450 nm antes de 15 minutos luego de haber agregado la solución de frenado.

Cálculo de los resultados

- Se calculó la media de la DO₄₅₀ de los blancos 8 pocillos (A1 y B1)
- La DO₄₅₀ corregida de todas las muestras se calculó restando la media de la DO₄₅₀ de los blancos
- El porcentaje de positividad (PP) de las referencias 2 y 3 y de las muestras del ensayo se calculó según la siguiente fórmula:

$$PP = \left[\frac{DO_{450} \text{ corregida de las muestras}}{DO_{450} \text{ corregida del suero de referencia}} \right] \times 100$$

El PP se expresa como la DO₄₅₀ corregida de todas las muestras sobre la media de la DO₄₅₀ corregida del suero de la referencia 1 (pocillos C1 y D1).

Interpretación de los resultados

Criterios de validación

- La media de los blancos (pocillos A1 y B1) debe ser < 0,150.
- La DO₄₅₀ corregida de la referencia 1 (pocillos C1 y D1) debe ser ≥ 1,000.
- La media del PP del suero de la referencia 2 debe ser < 20.
- La media del PP del suero de la referencia 3 debe estar comprendida entre 20 y 60.

Interpretación del porcentaje de inhibición

- PP = < 20 % Negativa
- PP = 20 % - 45 % Dudosa
- PP = > 45 % Positiva

La sensibilidad y especificidad es de 96.8% y 100% respectivamente.

5.4. *Neospora caninum*.

El kit utilizado para la detección de anticuerpos específicos frente a *Neospora caninum* fue INGEZIM NEOSPORA (Prod Ref: 12.NC.K1) de la empresa INGENASA. Este inmunoensayo enzimático (ELISA) detecta la presencia de anticuerpos específicos de *N. caninum* en suero bovino. Las muestras de suero se diluyen 1/200 y se incuban durante 45 minutos en los pocillos sensibilizados con antígeno de *N. caninum* (aislado NC1). Tras un primer lavado, se añade un conjugado anti-IgG bovina y se incuba 30 minutos más. Después de lavar, se añade el sustrato y tras 15 minutos la reacción se frena y el desarrollo de color en las placas se lee en un lector de ELISA. El color verde en los pocillos indica la presencia de anticuerpos específicos de *N. caninum*. Cuanto más alta sea la concentración de anticuerpos en la muestra de suero más intenso será el color verde en el pocillo y por tanto mayor se la densidad óptica. El protocolo se describe a continuación:

a. Preparación de las muestras: Dilución 1/200 utilizando la solución de lavado 1×. Para ello se añadió 796 µl de solución de lavado 1× y 4 µl de suero a un tubo. Se agitó para una correcta homogenización de la mezcla.

b. Preparación de los reactivos:

Solución de lavado: Solución 1/10 en agua destilada de la solución concentrada. Se preparó 100 ml de solución 10 × en 900 ml de agua destilada.

Conjugado: Dilución del conjugado con solución de lavado 1 ×.

A continuación se detalla paso a paso el procedimiento de la técnica:

1. Antes de empezar el ensayo, equilibrar placas, sustrato, solución de frenado y solución de lavado a temperatura ambiente.
2. Dispensar 100 µl de solución de lavado a los pocillos para blancos (A1 y A2), 100 µl de control negativo en dos pocillos (B1 y B2), 100 µl de control positivo en C1 y C2 y 100 µl de cada muestra diluida. Tapar la placa.

3. Incubar durante 45 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
4. Lavar tres veces con solución de lavado; en cada lavado se utiliza 300 μl por pocillo.
5. Añadir 100 μl del conjugado preparado a cada pocillo y tapar la placa.
6. Incubar por 30 minutos a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.
7. Lavar cuatro veces, añadiendo 300 μl con el lavador automático en cada pocillo.
8. Añadir 100 μl del sustrato a cada pocillo, agitar suavemente y mantener la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y en oscuridad.
9. Añadir 100 μl de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden en que se dispensó el sustrato.
10. Lectura de los valores de absorbancia a 450 nm dentro de los siguientes 15 minutos.

Lectura de los resultados

a. Cálculo de DO corregida:

- DO control positivo (DO+): Se calculó la DO media de los pocillos (C1, C2) y se restó la media de los pocillos blancos (A1, A2).
- DO control negativo (DO-): Se calculó la media de los dos pocillos (B1, B2) y se restó la media de los pocillos blancos (A1, A2).
- DO muestras (DOm): Al valor de DO, se restó el valor medio de los pocillos blanco (A1, A2).

b. Cálculo del Ratio:

Para obtener el ratio de muestras o controles, se dividió cada DO corregida de la muestra o control (M), entre la DO corregida del control positivo (P):

$$RATIO = DO_M - \frac{DO_B}{DO_P} - DO_B$$

c. Validación del test:

El test se consideró válido cuando:

- La DO+ corregida $\geq 0,75$
- Ratio del control negativo < 0.25

Interpretación de resultados

- Ratio de la muestra ≥ 0.6 se consideró positivo
- Ratio de la muestra < 0.45 se consideró negativo
- Ratio de la muestra < 0.6 pero ≥ 0.45 se consideró dudoso

La sensibilidad y especificidad del kit de acuerdo a la información proporcionada por el fabricante es de 99.40 % y 100.00 % respectivamente.

6. Métodos y análisis estadísticos.

Los datos epidemiológicos, tanto colectivos como individuales, obtenidos mediante las encuestas se analizaron usando el programa estadístico SPSS® 15.0 para Windows. Así mismo, los resultados de los análisis serológicos se incluyeron en la base de datos junto con las variables procedentes de la encuesta.

6.1. Eliminación de variables.

Las variables incluidas con fines de identificar la explotación, tales como el nombre y dirección del propietario, o la localidad a la que pertenecía la explotación

fueron eliminadas de cara a la realización del análisis estadístico, así como aquellas variables dicotómicas en que una de las posibilidades superaba en frecuencia el 95 por ciento, debido a la dificultad para alcanzar conclusiones estadísticas relevantes con estas variables. Así mismo, dependiendo del agente estudiado, se eliminaron en el análisis algunas variables adicionales debido a que la asociación con la infección no resultaba plausible.

6.2. Clasificación y codificación.

Las variables nominales fueron codificadas forma numérica con objeto de facilitar su tratamiento estadístico con el programa SPSS 15.0 mediante la asignación de un número a cada una de las categorías (primera categoría, 1, segunda, 2 y así sucesivamente). Por otra parte, a las variables dicotómicas se les asignó el valor 1 si la respuesta era afirmativa y 2 en caso contrario (Thrusfield, 2007).

6.3. Análisis estadístico.

Análisis descriptivo.

En el caso de las variables nominales o categóricas, se determinó la distribución de frecuencias de cada categoría. Para las variables de diagnóstico serológico, la distribución de frecuencias proporciona directamente la prevalencia de infección, o la dispersión en el caso de que la prevalencia se haya calculado por explotaciones.

Para las variables numéricas se calcularon los principales estadísticos de tendencia central (media, mediana y moda) y de dispersión (varianza y desviación típica), así como el rango y los valores máximo y mínimo. Aquellas variables con más de dos categorías se transformaron en dicotómicas mediante una categoría de referencia. En el caso de *Neospora*, se decidió además categorizar las variables numéricas según la mediana, obteniéndose así dos categorías para cada variable.

Análisis bivariado.

La selección de las variables antes de generar el modelo multivariante con los factores de riesgo se realizó en dos pasos, que fueron distintos según el tipo de variable. Así, para las variables nominales o categóricas se calculó en primer lugar la Chi cuadrado, seleccionándose aquellas variables con una $p < 0,2$. A continuación, se estableció la existencia de correlaciones entre las distintas variables independientes mediante el cálculo de la Rho de Spearman. Cuando dos variables de este tipo de encontraron asociadas con un valor de Rho $> 0,4$, tan solo se seleccionó aquella variable cuya asociación con la infección resultaba más plausible.

Respecto a las variables cuantitativas (que permanecieron como tales en todos los modelos menos *Neospora*), la selección inicial fue realizada, tras comprobar que todas las variables seguían una distribución no paramétrica, mediante un test Z de Kolmogorov-Smirnov para muestras independientes, seleccionándose aquellas variables para las que se encontraron diferencias entre seropositivos y seronegativos con una p inferior a 0,05. A continuación, se verificó la existencia de correlaciones entre las variables cuantitativas independientes mediante una prueba r de Pearson, seleccionándose sólo aquellas variables con una asociación más plausible con la infección cuando el valor de r fue superior a 0,4.

Análisis multivariado.

A partir de las variables seleccionadas en el paso anterior, se crearon modelos GEE (Generalized Estimating Equations model) para cada una de las infecciones incluidas en el estudio, utilizándose la granja como efecto aleatorio. Las variables se fueron introduciendo una a una, evaluándose el efecto que tenían sobre el modelo global a fin de ver si mejoraba con la incorporación de cada nueva variable (test de la razón de verosimilitud de Wald, $p < 0.05$). En el modelo final se controló el efecto de variables confundentes y de interacciones potencialmente relevantes entre las variables independientes. La elección del modelo óptimo se basó en el criterio de casi-verosimilitud bajo un modelo de independencia (QIC).

La determinación de las variables asociadas a la infección de cada uno de los agentes estudiados nos permite, en última instancia, diseñar un plan de lucha para la población de estudio. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS 15.0 para Windows.

7. Diseño del mapa coroplético

Los mapas coropléticos son mapas temáticos en el que las regiones o áreas se colorean mediante distintas tonalidades para representar cartográficamente la prevalencia, de tal manera que tonalidades más oscuras se corresponden con mayores prevalencias. Para cada agente se han realizado dos mapas, uno para la prevalencia individual y otro para la dispersión.

Los mapas coropléticos de las infecciones se diseñaron en el programa informático Arc.GIS 9 Arc. Map. Versión 9.2 y gvSIG 2.00 a través de la ubicación de los puntos o coordenadas UTM (GPS Magellan Explorist 600) de cada una de las granjas muestreadas.

V RESULTADOS

1. Análisis Descriptivo

El resultado del análisis de las variables de diagnóstico serológico indica la prevalencia de infección o la dispersión si según se considere como unidad el animal o la explotación, respectivamente. La prevalencia real se determinó con base en la prevalencia aparente obtenida y a la sensibilidad y especificidad de las pruebas de diagnóstico establecida por los fabricantes de los kits de cada una de las enfermedades analizadas. En el presente estudio tanto la prevalencia individual como la dispersión es mayor para *Neospora caninum* (33% y 78,2%) en relación a los otros agentes que mantienen valores menores al 17% y 47%; estos resultados se expresan en la tabla R1.

Tabla R1. Análisis descriptivo de las variables dependientes

	<i>Brucella</i> spp.	<i>Coxiella</i> <i>burnetii</i>	<i>L. interrogans</i> serovar Hardjo	<i>Neospora</i> <i>caninum</i>
Prevalencia aparente	16,7%	14,5%	16,5%	33,0%
Prevalencia real	17,0%	12,6%	13,7%	33,2%
Dispersión	45,1%	46,9%	42,0%	78,2%
Prevalencia intrarrebaño	10-100%	8-100%	12,5-100%	9-100%
	38,9%	25,0%	36,46%	42,3%

Las variables independientes contenidas en el cuestionario se analizaron de acuerdo a sus características, calculándose la distribución de frecuencias para las variables categóricas y los estadísticos de tendencia central y de dispersión para las numéricas o cuantitativas. En la tabla R2 se expone la distribución de frecuencias de las variables independientes categóricas. El mayor número de muestras obtenidas corresponde a la provincia costera de Manabí, observándose además que la ausencia de instalaciones, el pastoreo o manejo extensivo, así como la monta natural en el manejo reproductivo caracterizan a la mayoría de las granjas participantes en el estudio.

Tabla R2. Frecuencia de las variables independientes categóricas.

Variable	Categoría	Número de animales	Frecuencia (%)
Provincia	Azuay	401	15,0
	Manabí	814	30,5
	Sto. Domingo	261	9,8
	Pichincha	381	14,3
	Cotopaxi	278	10,4
	Tungurahua	170	6,4
	Chimborazo	221	8,3
	Zamora Chinchipe	140	5,2
Estación	Húmeda	961	36,0
	Seca	1706	64,0
Aptitud	Láctea	1772	66,4
	Mixta	894	33,5
Instalaciones	Si	916	34,3
	No	1750	65,6
Ventilación	Buena	2492	93,4
	Regular	64	2,4
	Mala	110	4,1
Limpieza	Buena	511	19,2
	Regular	729	27,3
	Mala	1426	53,5
Sala de Ordeño	Si	541	20,3
	No	2125	79,7
Manga de manejo	Si	960	36,0
	No	1706	64,0
Establo	Si	834	31,3
	No	1832	68,7
Cama	Pasto	1206	45,2
	Tierra	1078	40,4
	Cemento	366	13,7
	Viruta	16	0,6
Cercas	Si	2289	85,8
	No	377	14,1
División de pastos	Si	1428	53,5
	No	1238	46,4
Pediluvios	Si	32	1,2
	No	2634	98,8
Asistencia a ferias	Si	1680	63,0
	No	986	37,0
Desvieje	Sí	1305	48,9
	No	1150	43,1
Reposición	Sí	983	36,9
	No	1472	55,2

.../...

Tabla R2 (continuación)

Variable	Categoría	Número de animales	Frecuencia (%)
Regreso de animales tras ferias	Si	1415	53,1
	No	1251	46,9
Visitas a la explotación	Técnico IA	58	2,2
	Veterinarios	2014	75,5
	Otros	594	22,3
Mezcla de rebaños	Si	1321	49,5
	No	1345	50,4
Presencia de ovejas	Si	629	23,6
	No	2037	76,4
Presencia de rumiantes salvajes	Si	440	16,5
	No	2226	83,5
Explotaciones ganaderas colindantes	Si	1142	42,8
	No	1524	57,1
Origen de los animales	Compra	155	5,8
	Nacidos en granja	1374	51,5
	Compra y reposición propia	1137	42,6
Ingesta de calostro	Si	1807	67,8
	No	859	32,2
Alimentación del ternero	Leche	2462	92,3
	Sustituto	204	7,6
Uso de leche con mamitis	Si	1595	59,8
	No	1071	40,2
Número de tomas de leche al día	Una vez al día	113	4,2
	Dos veces al día	1548	58,0
	<i>Ad libitum</i>	1005	37,7
Fuente de agua	Pozo	723	27,1
	Río/arroyo	1830	68,6
	Potable	113	4,2
Balanceado	Si	869	32,6
	No	1797	67,4
Origen del balanceado	Ninguno	1799	67,5
	Comercial	819	30,7
	Fabricación propia	48	1,8
Pastoreo	Si	2666	100,0
	No	0	0
Suplementación alimenticia	Si	2149	80,6
	No	517	19,4
Suplementación minerales y vitaminas	Ninguno	16	0,6
	Sales minerales y vitaminas	124	4,6
Otros alimentos	Si	1301	48,8
	No	1365	51,2
Tipos de alimentos	Ningún producto	54	2,0
	Caña de azúcar, melaza, azúcar morena solidificada	86	3,2

.../...

Tabla R2 (continuación)

Variable	Categoría	Número de animales	Frecuencia (%)
Tipo de reproducción	Monta dirigida	47	1,8
	Inseminación artificial	660	24,7
	Monta libre	1959	73,5
Sincronización de partos	Si	392	14,7
	No	2274	85,3
Vacuna IBR	Si	161	6,0
	No	2505	93,9
Vacuna DVB	Si	161	6,0
	No	2505	93,9
Vacuna Triple (clostridiales)	Si	1925	72,2
	No	741	27,8
Vacunación a terneros	Si	1410	52,9
	No	1256	47,1
Vacunación otras enfermedades	Aftosa	23	0,9
	Aftosa, brucelosis, rabia	8	0,3
	Aftosa, rabia	101	3,8
	Aftosa, rabia, leptospirosis	8	0,3
Revacunación	Si	1871	70,2
	No	795	29,8
Desinfección de cordón umbilical	Si	824	30,9
	No	1842	69,1
Desparasitación de adultos	Si	1656	62,1
	No	1010	37,9
Desparasitación de terneros	Si	1650	61,9
	No	1016	38,1
Cuarentena	Si	548	20,5
	No	2118	79,4
Seropositividad <i>Neospora caninum</i>	Positivo	880	33,0
	Negativo	1787	67,0
Seropositividad <i>Coxiella burnetii</i>	Positivo	385	14,4
	Negativo	2282	85,6
Seropositividad <i>L. interrogans</i> serovar Hardjo	Positivo	441	16,5
	Negativo	2226	83,5
Sexo	Macho	409	15,3
	Hembra	2257	84,6
Raza	Criollo	1604	60,1
	Mestizo	942	35,3
	Holstein Friesian	120	4,5

.../...

Tabla R2 (continuación)

Variable	Categoría	Número de animales	Frecuencia (%)
Mes de toma de datos	Enero	45	1,7
	Febrero	129	4,8
	Marzo	16	0,6
	Junio	43	1,6
	Julio	75	2,8
	Agosto	161	6,0
	Septiembre	552	20,7
	Octubre	656	24,6
	Noviembre	218	8,2
	Diciembre	771	28,9

Según se describió previamente, para el análisis de las variables independientes numéricas se calcularon los principales estadísticos de tendencia central y de dispersión: media, mediana, moda, varianza y los valores mínimo y máximo. Los resultados se presentan en la tabla R3.

Tabla R3. Estadísticos de tendencia central y de dispersión de las variables independientes numéricas.

Variable	Media	Mediana	Moda	Varianza	Mínimo	Máximo
Edad (meses)	46,2	48	48	982,48	3	180
Edad del destete (meses)	4,01	5	<1	11,32	<1	88
Densidad de granjas en el área	69,81	80	100	815,50	1	100
Antigüedad de la finca (años)	26,22	20	20	441,33	<1	200
Tamaño total de la finca (hectáreas)	110,60	30	40	93511,3	<1	3200
Tamaño útil de la finca (hectáreas)	82,42	25	30	55204,12	<1	3200
Número de bovinos	82,78	40	60	21507,90	2	1600
Número de terneros	18,94	9	3	1438,53	0	500
Número de hembras en producción	24,05	13	5	947,42	0	230
Edad del desvieje (años)	10,85	10	12	7,91	0	40
Porcentaje de desvieje	3,51	0	0	34,61	<1	40
Porcentaje de reposición	7,34	0	0	351,15	<1	100
Distancia a granja más cercana (m)	371,78	20	1	357855,98	0,5	3000
Pendiente media de la granja (%)	16,12	15	0	230,81	0	60
Altura (m)	1639,97	1767,07	200	1818645,44	2,5	3914,77
Última asistencia a ferias ganaderas (semanas)	7,08	1	0	221,78	<1	48
Mortalidad terneros (% anual)	14,78	10	<1	337,66	<1	100
Mortalidad adultos (% anual)	4,44	1	<1	59,31	<1	45
Presencia de diarreas (% actual)	15,95	10	0	473,14	0	100
Porcentaje anual de abortos (% actual)	8,72	5	<1	110,89	0	60

2. Análisis bivariante

Este análisis se realizó para cada uno de los agentes y de acuerdo al tipo de variable. Para las variables nominales o categóricas se calculó la Chi cuadrado, seleccionándose aquellas variables con una $p < 0,2$. En el caso de las variables cuantitativas se utilizó un test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov para todos los agentes a excepción de *N. caninum* y las variables seleccionadas fueron aquellas para las que se encontraron diferencias entre seropositivos y seronegativos con una $p < 0,05$. En las tablas R4 a R10 se describen las variables seleccionadas para cada agente con los valores de Chi cuadrado o Z Kolmogorov-Smirnov.

Tabla R4. Variables seleccionadas en el análisis univariado para seropositividad de *Brucella abortus* en bovinos de aptitud láctea y mixta de Ecuador ($p < 0,2$).

Variable	Categoría	Seropositividad		Chi-cuadrado	
		Positivo No. (%)	Negativo No. (%)	Chi	p
Criollo	Si	235(14,6)	1370(85,4)	12,19	<0,001
	No	210(19,8)	851(80,2)		
Mestizo	Si	184 (19,7)	751 (80,3)	9,24	0,002
	No	261 (15,1)	1470 (84,9)		
Sexo	Macho	28 (6,8)	381 (93,2)	33,71	<0,001
	Hembra	417 (18,5)	1839 (81,5)		
Estación	Seca	257 (15,1)	1448 (84,9)	8,91	0,003
	Húmeda	188 (19,6)	773 (80,4)		
Provincia andina	Si	285 (19,6)	1166 (80,4)	19,93	<0,001
	No	160 (13,2)	1055 (86,8)		
Aptitud	Láctea	357 (20,2)	1414 (79,8)	45,44	<0,001
	Mixta	88 8 (9,8)	806 (90,2)		
Limpieza	Buena	231 (19,4)	959 (80,6)	11,44	0,001
	Mala	214 (14,5)	1262 (85,5)		
Monta natural	Si	299 (15,3)	1659 (84,7)	10,71	0,001
	No	146 (20,6)	562 (79,4)		
Monta dirigida	Si	1 (2,1)	47 (97,9)	7,50	0,006
	No	444 (17,0)	2174 (83,0)		
Inseminación artificial	Si	146 (21,7)	526 (78,3)	16,38	<0,001
	No	299 (15,0)	1695 (85,0)		
Sincronización de partos	Si	94 (24,0)	298 (76,0)	17,52	<0,001
	No	351 (15,4)	1922 (84,6)		
Uso de leche con mamitis	Si	247 (15,5)	1347 (84,5)	4,12	0,042
	No	198 (18,5)	873 (81,5)		
Alimentación del ternero	Leche	378 (15,4)	2083 (84,6)	41,40	<0,001
	Sustituto	67 (32,8)	137 (67,2)		
Alimentación con balanceado	Si	173 (19,9)	696 (80,1)	9,55	0,002
	No	272 (15,1)	1524 (84,9)		
Suplementación alimenticia	Si	381 (17,7)	1767 82,3)	8,69	0,003
	No	64 (12,4)	454 (87,6)		
Fuente de agua	Si	42 (37,2)	71 (62,8)	35,58	<0,001
	No	403 (15,8)	2150 (84,2)		
					.../...

Tabla R4 (continuación)

Variable	Categoría	Seropositividad		Chi-cuadrado	
		Positivo No. (%)	Negativo No. (%)	Chi	p
Instalaciones	Si	78 (8,5)	837 (91,5)	66,92	<0,001
	No	367 (21,0)	1383 (79,0)		
Ventilación	Buena	367 (21,0)	1383 (79,0)	19,40	<0,001
	Mala	78 (8,5)	837 (91,5)		
Manga de manejo	Si	225 (23,4)	735 (76,6)	48,99	<0,001
	No	220 (12,9)	1485 (87,1)		
Sala de ordeño	Si	150 (76,8)	391 (72,3)	59,36	<0,001
	No	295 (13,9)	1829 (86,1)		
Cama-tierra	Si	136 (12,5)	956 (87,5)	23,88	<0,001
	No	309 (19,6)	1265 (80,4)		
Cama- cemento	Si	114 (31,1)	252 (68,9)	63,76	<0,001
	No	331 (14,4)	1969 (85,6)		
Cama-viruta	Si	6 (37,5)	10 (62,5)	5,01	0,025
	No	439 (16,6)	2211 (83,3)		
Cercas	Si	409 (17,9)	1880 (82,1)	15,97	<0,001
	No	36 (9,6)	340 (90,4)		
Presencia de rumiantes salvajes	Si	52 (11,8)	387 (88,2)	8,90	0,003
	No	393 (17,7)	1833 (82,3)		
Granjas bovinas colindantes	Si	152 (13,3)	989 (86,7)	16,35	<0,001
	No	293 (19,2)	1231 (80,8)		
Reposición externa	Si	22 (8,8)	227 (91,2)	12,19	<0,001
	No	423 (17,5)	1994 (82,5)		
Desparasitación de adultos	Si	340 (20,5)	1316 (79,5)	46,21	<0,001
	No	105 (10,4)	904 (89,6)		
Desparasitación de terneros	Si	333 (20,2)	1317 (79,8)	37,80	<0,001
	No	112 (11,0)	903 (89,0)		
Cuarentena	Si	111 (20,3)	437 (79,7)	6,28	0,012
	No	334 (15,8)	1783 (84,2)		
Seropositividad BHV1	Positivo	277 (19,8)	1122 (80,2)	10,63	0,001
	Negativo	167 (14,8)	959 (85,2)		
Seropositividad BLV	Positivo	104 (22,6)	356 (77,4)	13,93	<0,001
	Negativo	341 (15,5)	1863 (84,5)		
Seropositividad <i>Coxiella burnetii</i>	Positivo	97 (25,2)	288 (74,8)	23,40	<0,001
	Negativo	348 (15,3)	1933 (84,7)		
Seropositividad <i>L. interrogans</i> serovar Hardjo	Positivo	100 (22,7)	341 (77,3)	13,61	<0,001
	Negativo	345 (15,5)	1880 (84,5)		
División de pastos	Si	273 (19,1)	1155 (80,9)	12,95	<0,001
	No	172 (13,9)	1065 (86,1)		
Ingesta de calostro	Si	328 (18,2)	1478 (81,8)	8,630	0,003
	No	117 (13,6)	742 (86,4)		
Alimentación <i>Ad libitum</i>	Si	82 (8,2)	921 (91,8)	83,86	<0,001
	No	363 (21,8)	1300 (78,2)		
Vacunación a terneros	Si	258 (18,3)	1151 (81,7)	5,59	0,018
	No	187 (14,9)	1069 (85,1)		
Revacunación	Si	355 (19,0)	1515 (81,0)	23,55	<0,001
	No	90 (11,3)	705 (88,7)		

Tabla R5. Variables cuantitativas seleccionadas para seropositividad de *Brucella* en bovinos de aptitud láctea y mixta de Ecuador ($p < 0,05$).

Variable	Z Kolmogorov-Smirnov	<i>p</i>
Edad (meses)	2,88	<0,001
Número de bovinos	2,12	<0,001
Número de vacas	1,95	0,001
Número de terneros	1,45	0,030
Tamaño total de la finca (hectáreas)	1,74	0,005
Tamaño útil de la finca (hectáreas)	2,04	<0,001
Pendiente media en la granja (%)	1,68	0,007
Altura (m)	4,23	<0,001
Edad del destete (meses)	3,57	<0,001
Distancia a la granja más cercana	2,46	<0,001
Densidad de granjas en el área	3,18	<0,001
Mortalidad terneros (% anual)	3,26	<0,001
Presencia de diarrea (%)	2,25	<0,001
Porcentaje anual de abortos(%)	2,27	<0,001

Tabla R6. Variables seleccionadas en el análisis univariado para seropositividad de *Coxiella burnetii* en bovinos de aptitud láctea y mixta de Ecuador ($p < 0,2$).

Variable	Categoría	Seropositividad		Chi-cuadrado	
		Positivo No. (%)	Negativo No. (%)	Chi	<i>p</i>
Sexo	Macho	34 (8,5)	365 (91,5)	13,4	<0,01
	Hembra	352 (15,5)	1917 (84,5)		
Monta natural	Si	263 (13,4)	1696 (86,6)	6,5	<0,01
	No	123 (17,3)	586 (82,7)		
Monta dirigida	Si	2 (4,2)	46 (95,8)	4,2	0,04
	No	384 (14,7)	2236 (85,3)		
Inseminación artificial	Si	121 (18,0)	552 (82,0)	9,0	<0,01
	No	265 (13,3)	1730 (86,7)		
Desvieje	Si	198 (13,1)	1318 (86,9)	5,6	0,042
	No	188 (16,3)	964 (83,7)		
Alimentación del ternero	Leche	331 (13,5)	2129 (86,5)	26,1	<0,01
	Sustituto	55 (26,4)	153 (73,6)		
Alimentación con pienso	Si	150 (17,1)	726 (82,9)	7,4	<0,01
	No	236 (13,2)	1556 (86,8)		
Suplementación mineral	Si	330 (15,3)	1820 (84,7)	6,9	<0,01
	No	56 (10,8)	462 (89,2)		
Instalaciones	Si	91 (10,2)	802 (89,8)	19,8	<0,01
	No	295 (16,6)	1480 (83,4)		
Manga de manejo	Si	164 (17,1)	797 (82,9)	8,2	<0,01
	No	222 (13,0)	1485 (87,0)		
Cercado	Si	354 (15,5)	1937 (84,5)	12,7	<0,01
	No	32 (8,5)	345 (91,5)		
Visita de técnico de Inseminación artificial	Si	16 (27,6)	42 (72,4)	8,2	<0,01
	No	370 (14,2)	2240 (85,8)		
Mezcla de rebaños en la misma área	Si	216 (16,4)	1105 (83,6)	7,5	0,02
	No	170 (12,6)	1177 (87,4)		
Desordenes respiratorios durante el muestreo	Si	235 (15,9)	1243 (84,1)	5,5	<0,01
	No	151 (12,7)	1039 (87,3)		
Desinfección del cordón umbilical	Si	78 (9,4)	754 (90,6)	25,3	<0,01
	No	308 (16,8)	1528 (83,2)		
Estación	Seca	328 (15,8)	1743 (84,2)	14,0	<0,01
	Húmeda	58 (9,7)	539 (90,3)		
Seropositividad BRSV	Si	344 (16,3)	1766 (83,7)	13,0	<0,01
	No	39 (9,4)	377 (90,6)		
Seropositividad BHV1	Si	243 (17,4)	1156 (82,6)	11,9	<0,01
	No	140 (12,4)	987 (87,6)		
Seropositividad BLV	Si	85 (18,4)	376 (81,6)	7,1	<0,01
	No	301 (13,7)	1904 (86,3)		

Tabla R7. Selección de variables cuantitativas para seropositividad de *Coxiella burnetii* en bovinos de aptitud láctea y mixta de Ecuador ($p < 0,05$).

Variable	Z Kolmogorov-Smirnov	<i>p</i>
Edad (meses)	3,60	<0,001
Número de bovinos	2,34	<0,001
Número de vacas	3,41	<0,001
Número de terneros	1,74	0,005
Tamaño total de la finca (hectáreas)	1,31	0,064
Tamaño útil de la finca (hectáreas)	1,45	0,030
Altura (m)	1,86	0,002
Edad del destete (meses)	2,28	<0,001
Densidad de granjas en el área	1,24	0,092
Mortalidad terneros (% anual)	1,44	0,033
Mortalidad adultos (% anual)	1,96	0,001
Porcentaje anual de abortos (%)	1,21	0,108

Tabla R8. Variables seleccionadas en el análisis univariado para seropositividad de *L. interrogans* serovar Hardjo en bovinos de aptitud láctea y mixta de Ecuador ($p < 0,2$).

Variable	Categoría	Seropositividad (%)		Chi-cuadrado	
		Positivo No. (%)	Negativo No. (%)	Chi	(p)
Sexo	Macho	50(12,2)	359(87,8)	6,52	0,011
	Hembra	391(17,3)	1866(82,7)		
Estación	Húmeda	314(18,4)	1392(81,6)	11,99	0,001
	Seca	127(13,2)	834(86,8)		
Provincia andina	Si	179(12,3)	1273(87,7)	40,89	<0,001
	No	262(21,6)	953(78,4)		
Aptitud	Láctea	255(14,4)	1517(85,6)	17,71	<0,001
	Mixta	186(20,8)	708(79,2)		
Alimentación <i>Ad libitum</i>	Si	185(18,4)	819(81,6)	4,17	0,041
	No	256(15,4)	1407(84,6)		
Uso de leche con mamitis	Si	237(14,9)	1358(85,1)	8,14	0,004
	No	204(19,0)	867(81,0)		
Suplementación alimenticia	Si	377(17,5)	1772(82,5)	8,14	0,0004
	No	64(12,4)	454(87,6)		
Agua de pozo	Si	153(21,2)	570(78,8)	15,38	<0,001
	No	288(14,8)	1656(85,2)		
Agua potable	Si	259(14,2)	1564(85,8)	22,62	<0,001
	No	182(21,6)	662(78,4)		
Instalaciones	Si	79(8,6)	1388(79,3)	63,36	<0,001
	No	362(20,7)	837(91,4)		
Manga de manejo	Si	208(21,7)	752(78,3)	28,54	<0,001
	No	233(13,7)	1473(86,3)		
Establos	Si	183(21,9)	651(78,1)	25,64	<0,001
	No	258(14,1)	1574(85,9)		
Cama-pasto	Si	147 (12,1)	1066(87,9)	31,45	<0,001
	No	294 (20,2)	1160(79,8)		
Cama-tierra	Si	218 (20,0)	874(80,0)	15,74	<0,001
	No	223 (14,2)	1352(85,8)		
Cama-cemento	Si	75 (20,5)	291(79,5)	4,81	0,014
	No	366 (15,9)	1935(84,1)		
Cama-viruta	Si	7 (43,8)	9(56,3)	8,64	0,006
	No	434 (16,4)	2217(83,6)		
Asistencia a ferias	Si	252 (15,0)	1428(85,0)	7,82	0,005
	No	189 (19,2)	797(80,8)		
Reposición propia	Si	222(15,0)	1255(85,0)	5,43	0,020
	No	219(18,4)	81,6(59,0)		
Reposición externa	Si	210(18,6)	920(81,4)	5,96	0,015
	No	231(15,0)	1306(85,0)		
División de pastos	Si	273(19,1)	1155(80,9)	14,78	<0,001
	No	168(13,6)	1070(86,4)		
Presencia de ovejas	Si	52(8,3)	577(91,7)	40,83	<0,001
	No	389(19,1)	1648(80,9)		
					.../...

Tabla R8. (continuación)

Variable	Categoría	Seropositividad (%)		Chi-cuadrado	
		Positivo No. (%)	Negativo No. (%)	Chi	(p)
Mezcla de rebaños	Si	194(14,7)	1127(85,3)	4,07	0,044
	No	247(18,4)	1098(81,6)		
Granjas bovinas colindantes	Si	158(13,8)	984(86,2)	10,60	0,001
	No	283(18,6)	1241(81,4)		
Desinfección cordón umbilical	Si	92(11,2)	732(88,8)	24,97	<0,001
	No	349(18,9)	1493(81,1)		
Desparasitación de adultos	Si	328(19,8)	1328(80,2)	33,76	<0,001
	No	113(11,2)	897(88,8)		
Desparasitación de terneros	Si	331(20,1)	1319(79,9)	38,84	<0,001
	No	110(10,8)	906(89,2)		
Vacuna IBR	Si	39(24,2)	122(75,8)	7,32	0,007
	No	402(16,0)	2103(84,9)		
Vacuna DVB	Si	39(24,2)	122(75,8)	7,32	0,007
	No	402(16,0)	2103(84,0)		
Vacuna clostridiales	Si	346(18,0)	1579(82,0)	10,29	0,001
	No	95(12,8)	646(87,2)		
Vacunación terneros	Si	261(18,5)	1149(81,5)	8,41	0,004
	No	180(14,3)	1076(85,7)		
Revacunación	Si	374(20,0)	1497(80,0)	54,02	<0,001
	No	67(8,4)	728(91,6)		
Seropositividad IBR	Si	294(21,0)	1105(79,0)	40,16	<0,001
	No	130(11,5)	997(88,5)		
Seropositividad <i>Brucella</i>	Si	100(22,5)	345(77,5)	13,61	<0,001
	No	341(15,4)	1880(84,6)		
Seropositividad <i>Coxiella burnetii</i>	Si	95(24,7)	290(75,3)	21,60	<0,001
	No	346(15,2)	1936(84,8)		

Tabla R9. Selección de variables cuantitativas para seropositividad de *Leptospira interrogans* serovar Hardjo en bovinos de aptitud láctea y mixta de Ecuador ($p < 0,05$).

Variable	Z Kolmogorov-Smirnov	<i>p</i>
Edad (meses)	2,27	<0,001
Antigüedad de la finca (años)	1,57	0,015
Número de bovinos	5,58	<0,001
Número de vacas	3,78	<0,001
Número de terneros	5,20	<0,001
Tamaño total de la finca (hectáreas)	4,31	<0,001
Tamaño útil de la finca (hectáreas)	4,66	<0,001
Pendiente media en la granja (%)	1,71	0,006
Altura (m)	4,53	<0,001
Distancia a la granja más cercana	2,50	<0,001
Mortalidad adultos (% anual)	1,83	0,002
Porcentaje de desvieje	2,52	<0,001
Porcentaje de reposición	1,86	0,002

Tabla R10. Variables seleccionadas en el análisis univariado para seropositividad de *Neospora caninum* en bovinos de aptitud láctea y mixta de Ecuador ($p < 0,02$).

Variable	Categoría	Seropositividad		Chi-cuadrado	
		Positivo No. (%)	Negativo No. (%)	Chi	<i>p</i>
Edad (meses)	<48	384 (31,1)	851 (68,9)	7,02	0,008
	>48	376 (36,4)	658 (63,6)		
Número de bovinos	<30	371 (36,4)	649 (63,6)	6,89	0,009
	>30	389 (31,1)	860 (68,9)		
Número de terneros	<9	431 (38,1)	700 (61,9)	21,54	<0,001
	>9	329 (28,9)	809 (71,1)		
Aptitud	Láctea	555 (35,8)	996 (64,2)	11,52	0,001
	Mixta	205 (28,6)	513 (71,4)		
Suplementación mineral	Si	587 (31,9)	1252 (68,1)	10,81	0,001
	No	173 (40,2)	257 (59,8)		
Desvieje	Si	405 (30,9)	904 (69,1)	9,07	0,003
	No	355 (37,0)	605 (63,0)		
Agua de pozo	Si	234 (39,3)	362 (60,7)	12,07	0,001
	No	526 (31,4)	1147 (68,6)		
Agua de río/arroyo	Si	485 (31,1)	1073 (68,9)	12,49	<0,001
	No	275 (38,7)	436 (61,3)		
Sala de ordeño	Si	198 (37,6)	328 (62,4)	5,29	0,021
	No	562 (32,2)	1181 (67,8)		
Pastoreo	Si	414 (39,1)	646 (60,9)	27,62	<0,001
	No	346 (28,6)	863 (71,4)		
Instalaciones	Si	218 (29,7)	516 (70,3)	7,01	0,008
	No	542 (35,3)	993 (64,7)		
Cama -tierra	Si	249 (28,1)	636 (71,9)	18,71	<0,001
	No	511 (36,9)	873 (63,1)		
Visita Veterinario	Si	614 (35,4)	1119 (64,6)	12,33	<0,001
	No	146 (27,2)	390 (72,8)		
Visita otros	Si	125 (28,5)	313 (71,5)	5,99	0,014
	No	635 (34,7)	1196 (65,3)		
Presencia de rumiantes salvajes	Si	153 (39,5)	234 (60,5)	7,64	0,006
	No	607 (32,3)	1275 (67,7)		
Reposición externa	Si	339 (36,4)	592 (63,6)	6,03	0,014
	No	421 (31,5)	917 (68,5)		
					.../...

Tabla R10 (continuación)

Variable	Categoría	Seropositividad		Chi-cuadrado	
		Positivo No. (%)	Negativo No. (%)	Chi	<i>p</i>
Cercado	Si	632 (32,3)	1325 (67,7)	9,21	0,002
	No	128 (41,0)	184 (59,0)		
Presencia de ovejas en la granja	Si	211 (39,8)	319 (60,2)	12,39	<0,001
	No	549 (31,6)	1190 (68,4)		
Desinfección del cordón umbilical	Si	194 (27,2)	518 (72,8)	18,18	<0,001
	No	566 (36,4)	991 (63,6)		
Provincia andina	Si	486 (37,7)	803 (62,3)	23,73	<0,001
	No	274 (28,0)	706 (72,0)		
Hectáreas usadas por el ganado (%)	<70	378 (35,6)	683 (64,4)	4,067	0,044
	>70	382 (31,6)	826 (68,4)		

La colinearidad entre las distintas variables independientes seleccionadas se determinó en un segundo paso a través del cálculo de la Rho de Spearman para variables nominales y la *r* de Pearson para las variables cuantitativas. Se conservaron las variables más lógicamente asociadas con la infección si el valor de Rho o *r* fue $\geq 0,4$. En todos los casos la *p* asociada a Rho o *r* fue $< 0,001$. En las tablas R11 a R14 se presentan las variables eliminadas debido a la colinearidad.

Tabla R 11. Variables independientes eliminadas debido a la colinearidad (Rho de Spearman / *r* de Pearson $\geq [0,4]$) entre las variables nominales asociadas con la seropositividad a *Brucella abortus*.

Variable incluidas	Variables eliminadas	Rho de Spearman
Criollo	Mestizo	-0,89
Estación	Revacunación	0,46
Aptitud	Provincia andina	0,64
	Tierra	-0,51
Inseminación artificial	Monta natural	-0,94
	Sincronización de partos	0,57
	Balanceado	0,51
	Sala de ordeño	0,51
	División de pastos	0,41
Instalaciones	Manga de manejo	-0,45
	Cercas	0,48
Desparasitación de adultos	Desparasitación de terneros	0,91
Número de bovinos	Número de vacas	0,65
	Número de terneros	0,91
	Tamaño total de la finca (hectáreas)	0,68
	Tamaño útil de la finca (hectáreas)	0,65
Edad del destete	Altura	-0,54

Tabla R12. Variables independientes eliminadas debido a la colinearidad (Rho de Spearman / r de Pearson $\geq [0,4]$) entre las variables nominales asociadas con la seropositividad a *Coxiella burnetii*.

Variable incluidas	Variables eliminadas	Rho de Spearman
Inseminación artificial	Monta natural	-0,94
Número de bovinos	Número de vacas	0,65
	Número de terneros	0,91
	Total hectáreas de la granja	0,68
	Hectáreas utilizadas por el ganado	0,65

Tabla R13. Variables independientes eliminadas debido a la colinearidad (Rho de Spearman / r de Pearson $\geq [0,4]$) entre las variables nominales asociadas con la seropositividad a *Leptospira*.

Variable incluidas	Variables eliminadas	Rho de Spearman
Aptitud (Láctea)	Provincia andina	0,63
	Cama - tierra	-0,51
	Cama - pasto	0,42
Agua potable	Agua de río/arroyo	-0,90
Manga de manejo	Instalaciones	0,45
	Establos	0,56
Vacunación	Revacunación	0,40
Reposición propia	Reposición externa	-0,81
Presencia de ovejas en la granja	Contacto con bovinos de otro rebaño	0,41
Desparasitación de terneros	Desparasitación de adultos	0,92
Cercado	División de pastos	0,40
Número de bovinos	Número de vacas	0,65
	Número de terneros	0,91
	Total hectáreas de la granja	0,68
	Hectáreas utilizadas por el ganado	0,65

Tabla R14. Variables independientes eliminadas debido a la colinearidad (Rho de Spearman / r de Pearson $\geq [0,4]$) entre las variables nominales asociadas con la seropositividad a *Neospora caninum*.

Variable incluidas	Variable eliminadas	Rho de Spearman
Aptitud (Láctea)	Pastos	0,41
	Cama - tierra	-0,51
	Provincia andina	0,64
Número de terneros	Tamaño total	0,52
Agua de río/arroyo	Agua pozo	-0,88
Instalaciones	Establos	0,41
	Cercado	-0,47
Visita Veterinario	Otras visitas	-0,88
Reposición	Reposición externa	0,81

3. Análisis multivariable

Tras la selección de variables realizado en el análisis bivariable, la asociación entre las variables independientes y la seropositividad de los distintos agentes se evaluó a través de modelos GEE (Generalized Estimating Equations model), incluyendo la granja como efecto aleatorio. La definición del modelo óptimo se basó en el criterio de casi-verosimilitud bajo el modelo de independencia (QIC). En las tablas expuestas a continuación (tabla R15 a tabla R18) se exponen modelos obtenidos con las variables que mostraron asociación significativa ($p < 0,05$) con la seropositividad a *Brucella*, *Coxiella burnetii*, *L. interrogans* serovar Hardjo y *Neospora caninum*, respectivamente. En los cuatro modelos se incluye la variable edad; la variable sexo está asociada con la seropositividad de *Brucella* y *C. burnetii*, y desinfección del cordón umbilical con la seropositividad de *C. burnetii* y *L. interrogans* serovar Hardjo.

Tabla R 15. Modelo GEE y factores de riesgo significativamente asociados ($p < 0,05$) a seropositividad con *Brucella* en granjas de aptitud láctea y mixta en Ecuador.

Variables	Categoría	p	OR*	95% CI
Sexo	Hembra	0,001	2,03	1,32-3,13
	Macho			
Aptitud	Láctea	0,016	1,79	1,11-2,87
	Mixto			
Instalaciones	Si	0,006	1,80	1,19-2,74
	No			
Alimentación <i>Ad libitum</i>	Si	<0,001	0,32	0,19-0,54
	No			
Edad	-	0,023	1,005	1,00-1,02
Pendiente media de la granja (%)	-	0,020	1,013	1,00-1,03
Porcentaje anual de abortos	-	0,031	1,016	1,00-1,03

Criterio del modelo de independencia (QIC): 2149,6

Tabla R 16. Modelo GEE y factores de riesgo significativamente asociados ($p < 0,05$) a seropositividad con *Coxiella burnetii* en granjas de aptitud láctea y mixta en Ecuador.

Variable	Categoría	<i>p</i>	OR	CI _{95%}
Edad		<0,001	1,01	1,01-1,01
Alimentación de terneros	Sustituto	0,017	1,94	1,1-3,3
	Leche	-	-	-
Seropositividad BRSV	Si	0,032	1,54	1,1-2,3
	No	-	-	-
Desinfección del cordón umbilical	Si	0,005	0,60	0,4-0,9
	No	-	-	-

Criterio del modelo de independencia (QIC): 2071,7

Tabla R 17. Modelo GEE y factores de riesgo significativamente asociados ($p < 0,05$) a seropositividad con *Leptospira interrogans* serovar Hardjo en granjas de aptitud láctea y mixta en Ecuador.

Variable	Categoría	<i>p</i>	OR	CI _{95%}
Cama	Viruta	0,009	9,152	1,73-48,30
Desparasitación de terneros	Si	0,036	1,592	1,03-2,46
	No	-	-	-
Seropositividad <i>Coxiella burnetii</i>	Si	0,018	1,423	1,06-1,90
	No	-	-	-
Pediluvios	Si	0,030	8,403	1,23-57,57
	No	-	-	-
Edad		0,041	1,004	1,00-1,01
Sexo	Hembra	0,002	1,462	1,01-2,12
	Macho	-	-	-
Estación	Húmeda	0,002	2,850	1,47-5,53
	Seca	-	-	-
Desinfección del cordón umbilical	Si	0,000	0,431	0,27-0,68
	No	-	-	-

Criterio del modelo de independencia (QIC): 2089,24

Tabla R 18. Modelo GEE y factores de riesgo significativamente asociados ($p < 0,05$) a seropositividad con *Neospora caninum* en granjas de aptitud láctea y mixta en Ecuador.

Variab les	Categoría	<i>p</i>	OR	CI_{95%}
Edad	>48	0,007	1,278	1,07-1,53
Reposición externa		0,005	1,32	1,09-1,60
Número de terneros	<9	0,003	1,39	1,11-1,72
Rumiantes salvajes		0,011	1,36	1,08-1,73

Criterio del modelo de independencia (QIC):2859,52

4. Asociaciones entre los distintos agentes

Los resultados obtenidos se relacionaron para todos los agentes con el objetivo de determinar posibles asociaciones; en la tabla R19 y R20 se observa la asociación entre los agentes bacterianos y los valores calculados de Chi y la Odds Ratio respectivamente.

Tabla R 19. Asociación de la seropositividad de los agentes reproductivos incluidos en el estudio

		<i>Brucella</i> Positivo (nº/%)	<i>Coxiella</i> Positivo (nº/%)	<i>Leptospira</i> Positivo (nº/%)	<i>Neospora</i> Positivo (nº/%)
<i>Brucella</i>	% Positivo	-	97 (21,8)	100 (22,5)	160 (36,0)
	% Negativo	-	288 (13,0)	341 (15,4)	720 (32,4)
<i>Coxiella</i>	% Positivo	97 (25,2)	-	95 (24,7)	111 (28,8)
	% Negativo	348 (15,3)	-	346 (15,2)	769 (33,7)
<i>Leptospira</i>	% Positivo	100 (22,7)	95 (21,5)	-	153 (34,7)
	% Negativo	345 (15,5)	290 (13,0)	-	757 (32,7)
<i>Neospora</i>	% Positivo	160 (18,2)	111 (12,6)	153 (17,4)	-
	% Negativo	285 (16,0)	274 (15,3)	288 (16,1)	-

Tabla R.20. Estadísticos de la asociación de la seropositividad de *Brucella*, *Coxiella burnetii*, *Leptospira* Hardjo y *Neospora caninum*

		<i>Brucella</i>	<i>Coxiella</i>	<i>Leptospira</i>	<i>Neospora</i>
<i>Brucella</i>	Chi (<i>p</i>)	-	23,40 (<0,001)	13,61 (<0,001)	2,10 (0,148)
	OR (IC)	-	1,87 (1,5-2,4)	1,60 (1,2-2,1)	1,17 (0,9-1,4)
<i>Coxiella</i>	Chi (<i>p</i>)	23,40 (<0,001)	-	21,60 (<0,001)	3,53 (0,060)
	OR (IC)	1,87 (1,5-2,4)	-	1,83 (1,4-2,4)	0,80 (0,6-1,0)
<i>Leptospira</i>	Chi (<i>p</i>)	13,61 (<0,001)	21,60 (<0,001)	-	0,69 (0,406)
	OR (IC)	1,60 (1,2-2,1)	1,83 (1,4-2,4)	-	1,10 (0,9-1,4)
<i>Neospora</i>	Chi (<i>p</i>)	2,10 (0,148)	3,53 (0,060)	0,69 (0,406)	-
	OR (IC)	1,17 (0,9-1,4)	0,80 (0,6-1,0)	1,10 (0,9-1,4)	-

5. Mapas coropléticos

Los resultados obtenidos en el análisis serológico se acoplaron a la información obtenida en las encuestas con respecto a la ubicación geográfica de cada una de las unidades de producción intervenidas; se estableció así una representación gráfica sobre la distribución de la prevalencia de cada una de las enfermedades en estudio a nivel individual y de rebaño. Los mapas obtenidos se observan en las figuras R1 a R8.

Figura R1. Seroprevalencia de *Brucella* por individuos en granjas bovinas de producción láctea y mixta por provincias de Ecuador.

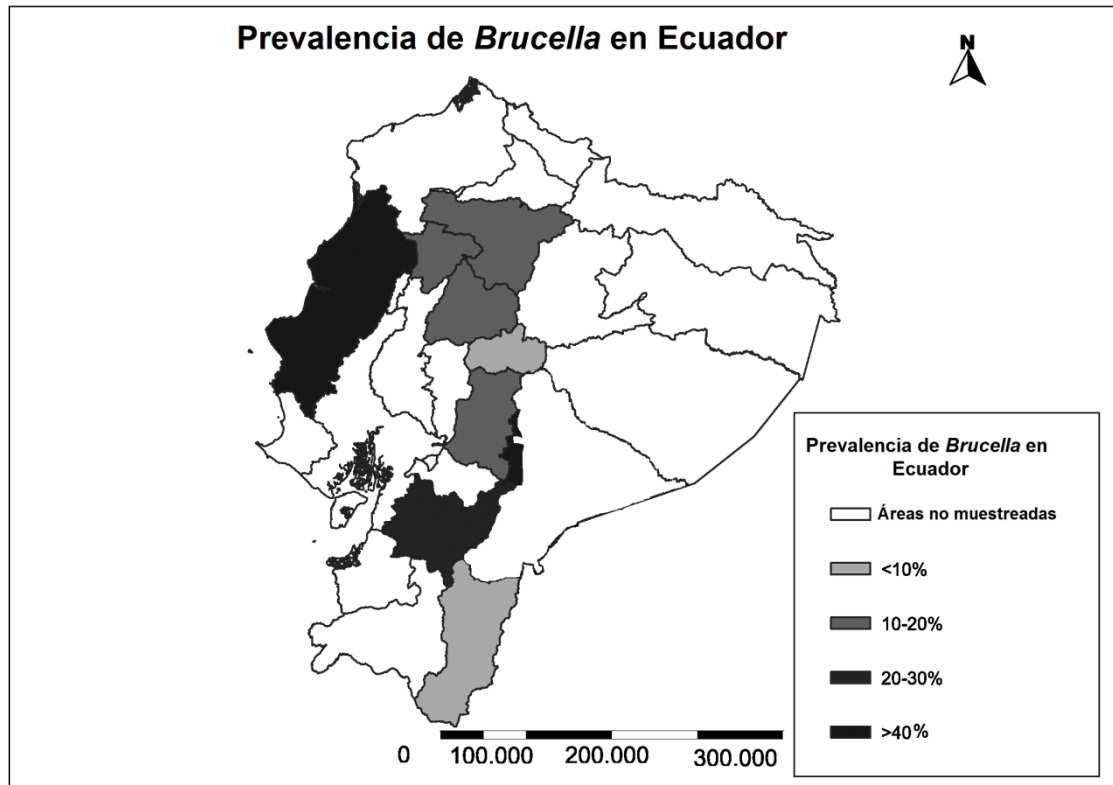


Figura R2. Seroprevalencia de *Brucella* en rebaños bovinos de producción láctea y mixta por provincias de Ecuador.

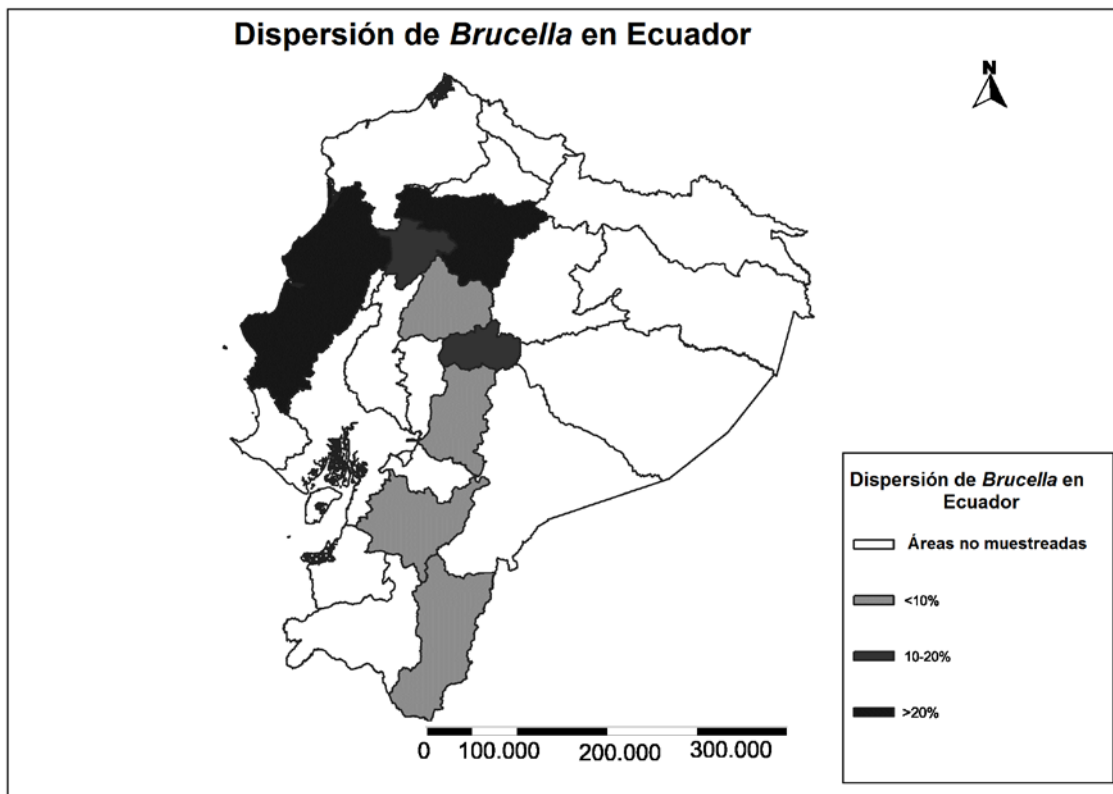


Figura R3. Seroprevalencia de *Coxiella burnetii* por individuos en granjas bovinas de producción láctea y mixta por provincias de Ecuador.

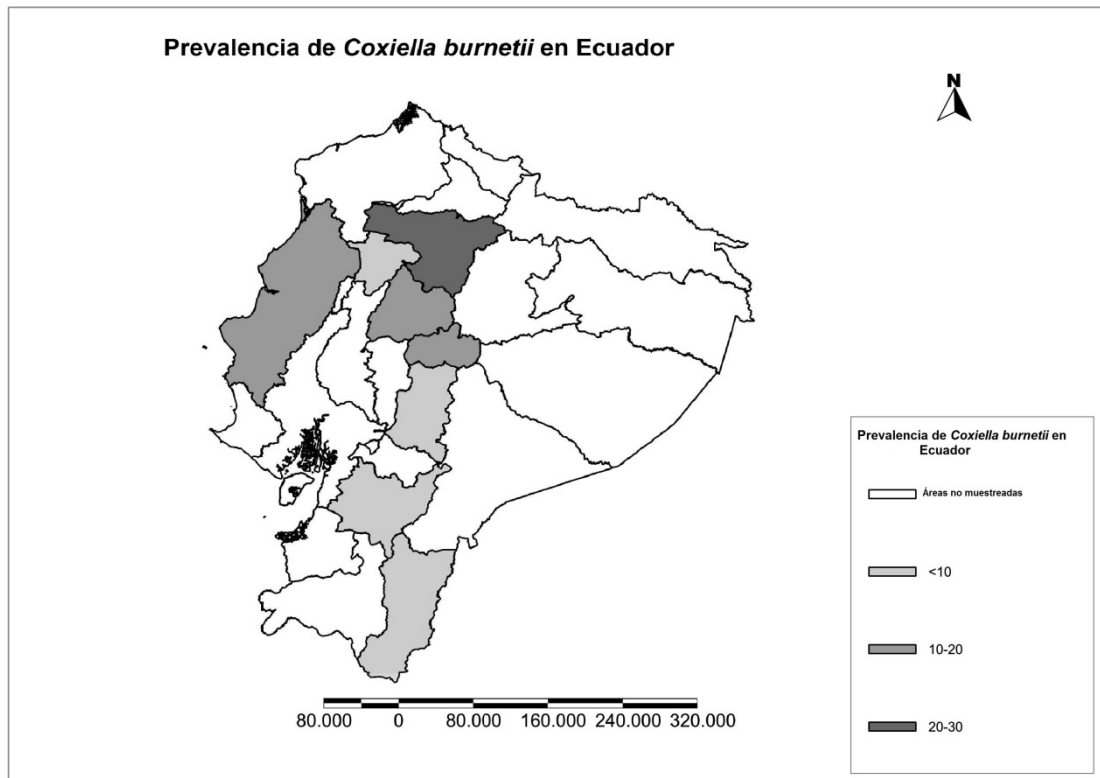


Figura R4. Seroprevalencia de *Coxiella burnetii* en rebaños bovinos de producción láctea y mixta por provincias de Ecuador.

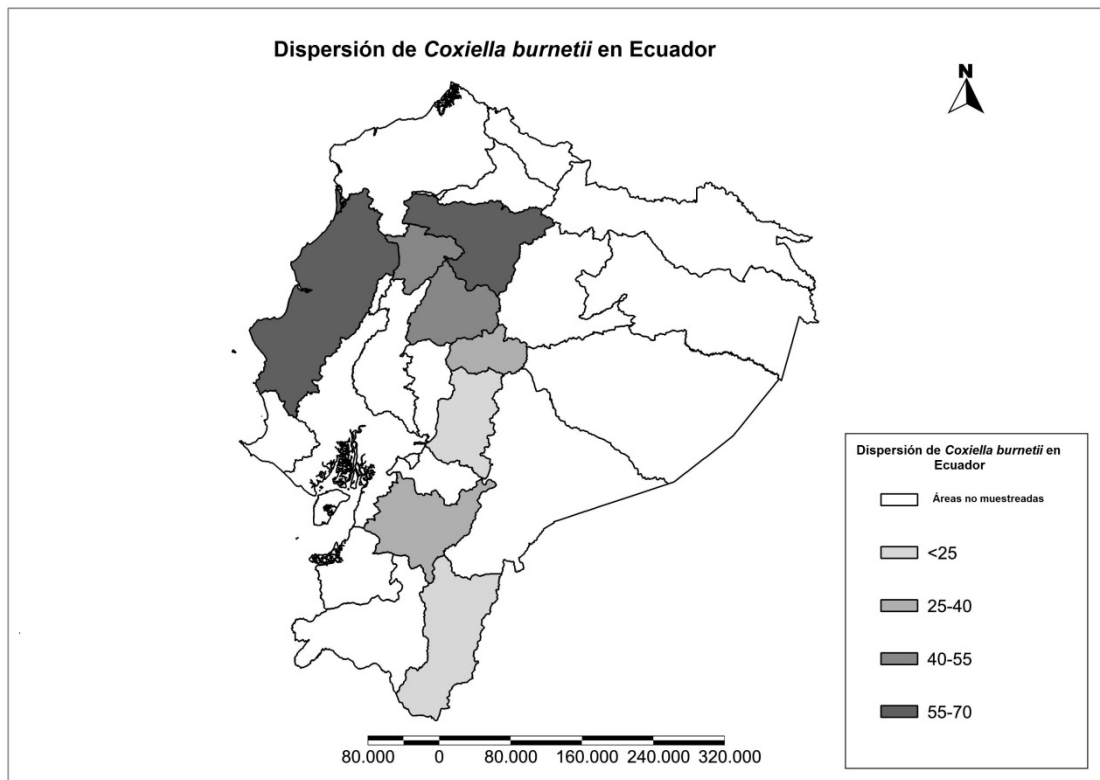


Figura R5. Seroprevalencia de *Leptospira interrogans* serovar Hardjo por individuos en granjas bovinas de producción láctea y mixta por provincias de Ecuador.

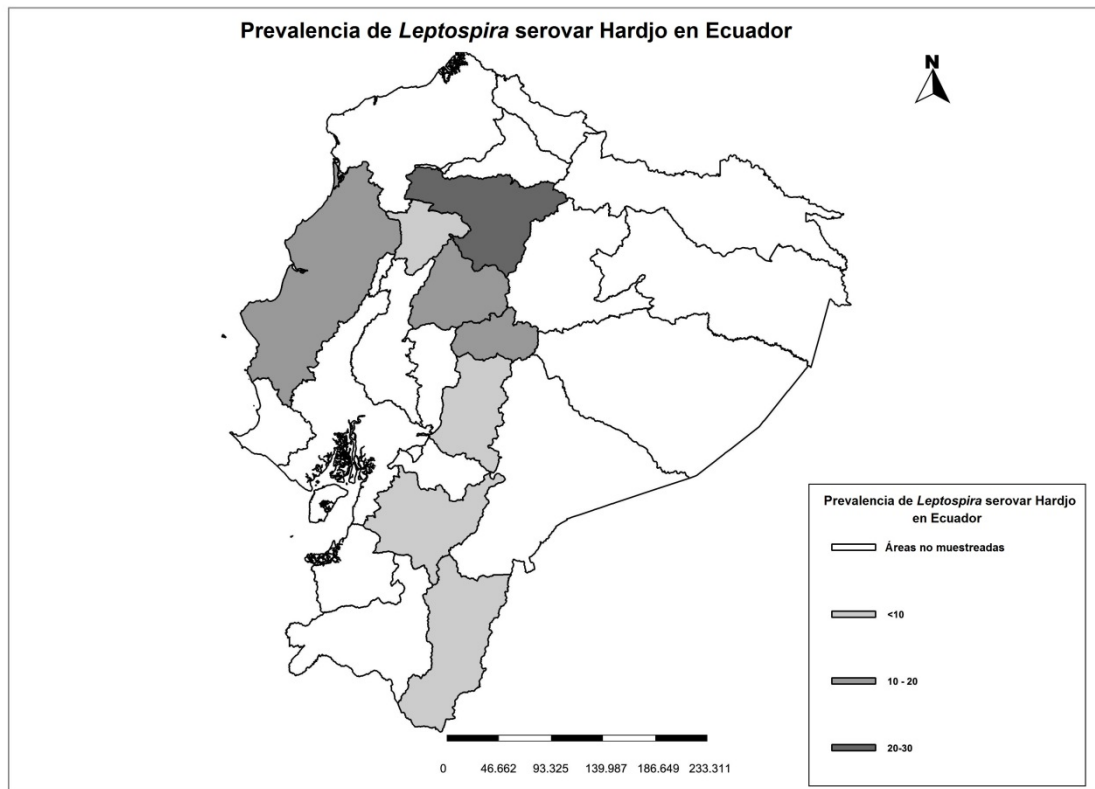


Figura R6. Seroprevalencia de *Leptospira interrogans* serovar Hardjo en rebaños bovinos de producción láctea y mixta por provincias de Ecuador.

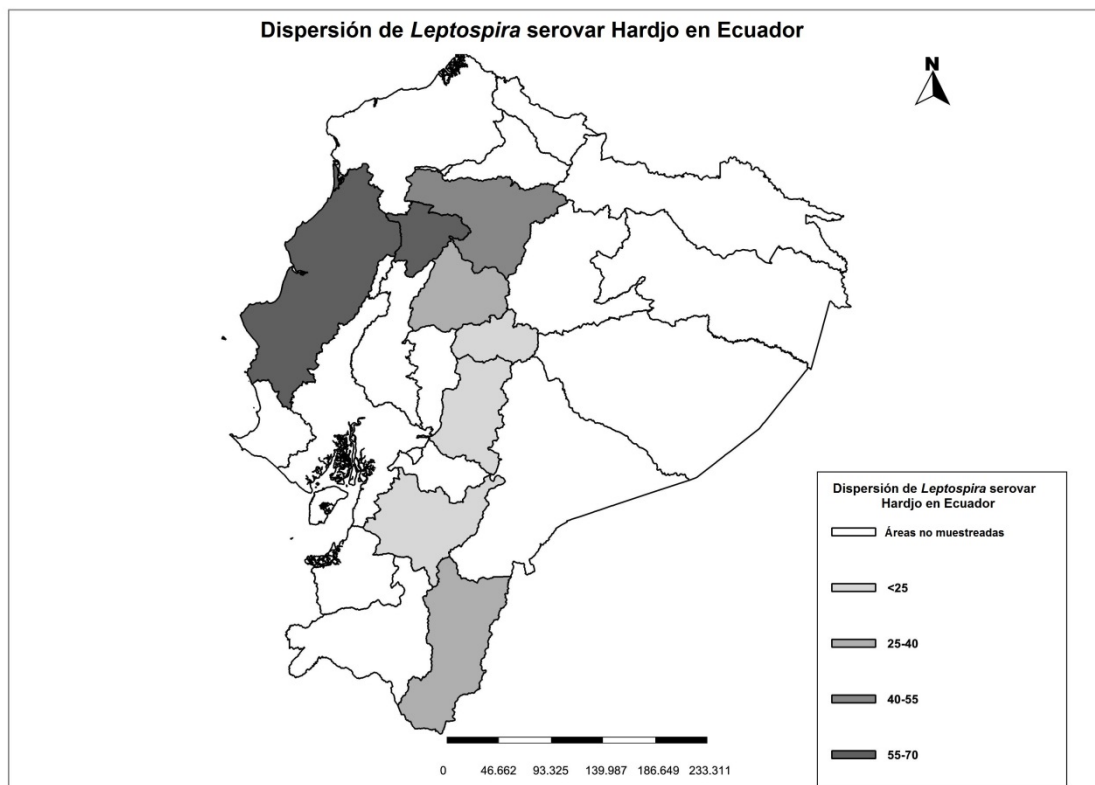


Figura R7. Seroprevalencia de *Neospora caninum* por individuos en granjas bovinas de producción láctea y mixta por provincias de Ecuador.

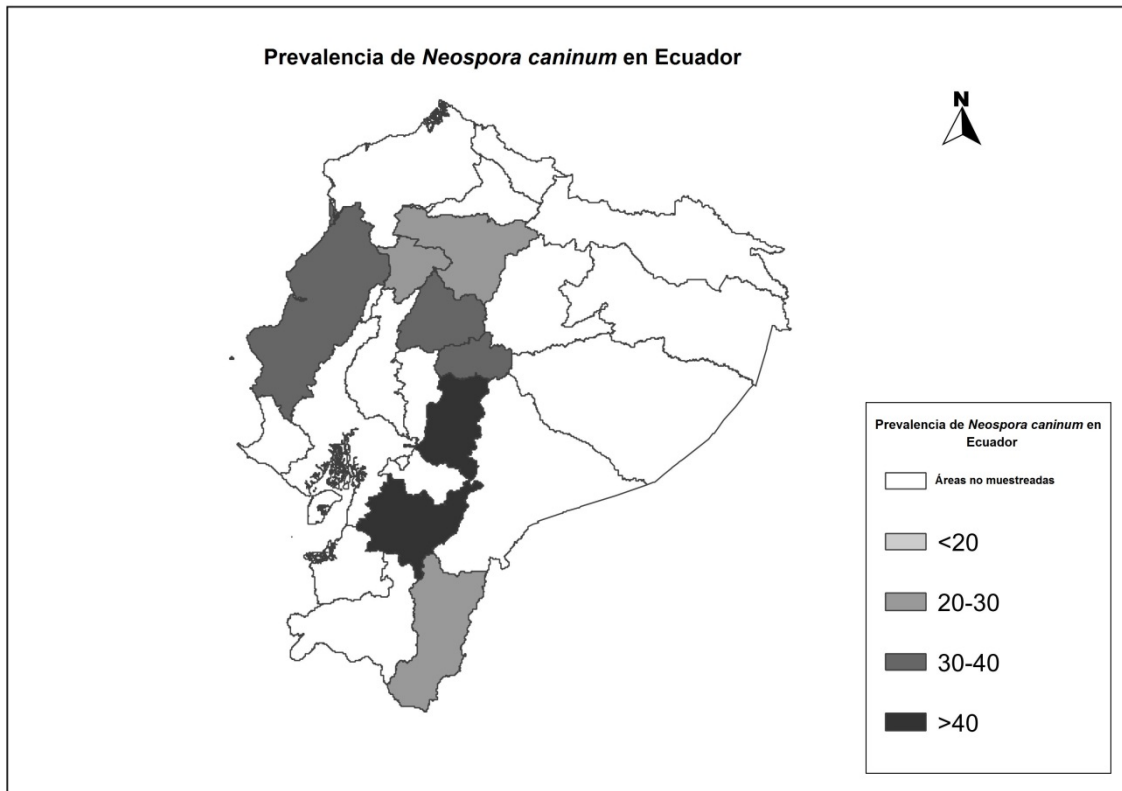
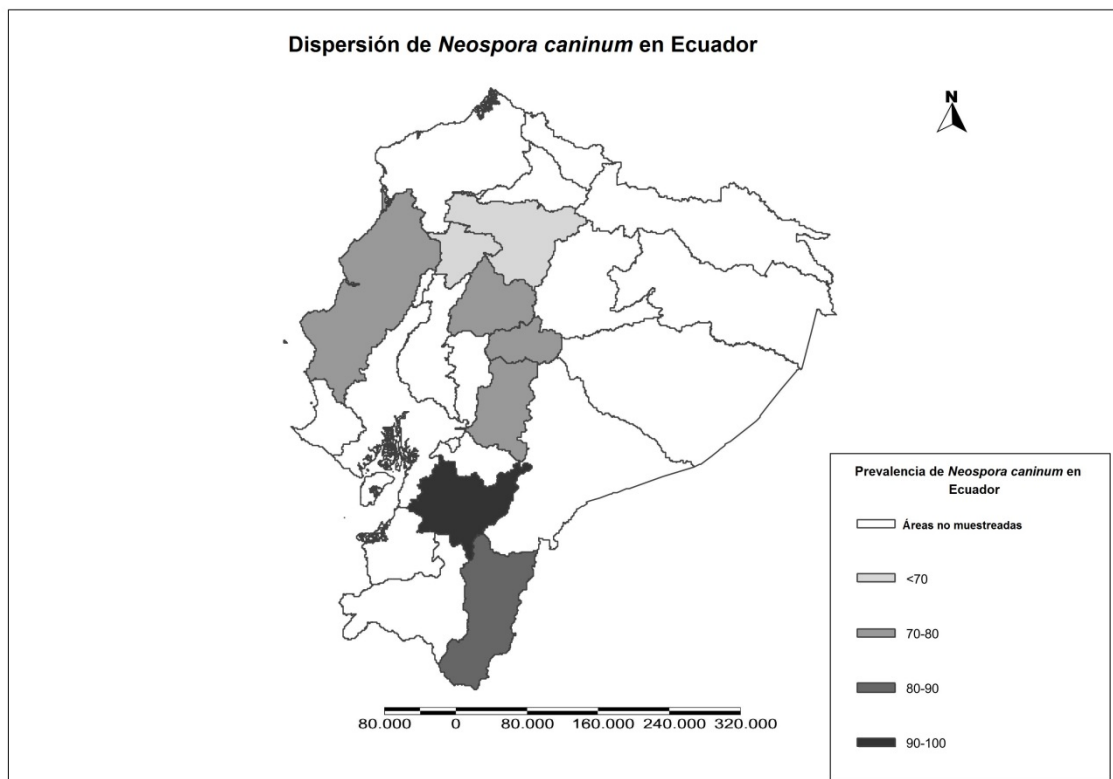


Figura R8. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en rebaños bovinos de producción láctea y mixta por provincias de Ecuador.



VI DISCUSIÓN

El diseño y cobertura a nivel nacional en el desarrollo del presente estudio permite obtener una imagen clara de la situación epidemiológica de los rebaños bovinos del Ecuador con respecto a los agentes en estudio. En el presente capítulo se analizan los resultados expuestos acerca de la seroprevalencia y factores de riesgos asociados a la infección por *Brucella*, *Coxiella burnetii*, *Leptospira* Hardjo y *Neospora caninum* en rebaños bovinos de producción láctea y mixta; se espera con ello contribuir al conocimiento y diseño de propuestas y políticas orientadas al control y posible erradicación de estas enfermedades.

Brucella.

Existen informes que aseveran la existencia de la brucelosis en Latinoamérica desde la primera década del siglo veinte (Lucero y cols., 2008). En los países limítrofes con Ecuador, Colombia y Perú, no existe excesiva información publicada en medios fiables sobre la situación de la brucelosis bovina. En una localidad de Colombia se realizó en el año 2003 un estudio sobre 756 muestras de leche de 200 rebaños bovinos en el que se determinó un 19,7% de prevalencia (Rivera y cols., 2003). Por otra parte, en Perú, en el año 2011, Zavala y cols. señalaron una prevalencia del 0,02% en rebaños bovinos de una localidad de la amazonía. En Ecuador, el primer estudio epidemiológico de brucelosis bovina se remonta al año 1979, encontrando una prevalencia entre 1,3 y 10,6% (AGROCALIDAD, 2009). Recientemente se han publicado estudios que describen la presencia de brucelosis bovina en localidades del norte del país, con prevalencias comprendidas entre 0% y 12,5% (Poulsen y cols., 2014; Rodríguez y cols., 2015).

En Ecuador no existen estudios epidemiológicos previos acerca de la dispersión publicados en revistas de difusión internacional, si bien se han encontrado algunos estudios locales realizados en el ámbito universitario donde se observa una gran variabilidad (1-48%). En este rango se sitúan también los resultados obtenidos en nuestro estudio (45,1%). Respecto a otros países de Sudamérica, los estudios señalan también gran variabilidad: de 0,02% a 41,19% en

Brasil (Chiebao y cols., 2015), 0,7% en Uruguay o 12,4% in Argentina (Aznar y cols., 2014; Fort y cols., 2015).

Respecto a la prevalencia individual nuestro hallazgo (17,0%) es superior a resultados encontrados en estudios previos realizados por organismos oficiales (10,1%) desde 2004 a 2009. En Ecuador existe un Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina establecido desde el año 2009 (AGROCALIDAD, 2009), pero es de aplicación voluntaria, no habiéndose encontrado que se siguiese en ninguna de las explotaciones bovinas muestreadas, por lo que no ha interferido con los resultados hallados en nuestro estudio. A nivel de Sudamérica, la prevalencia hallada en distintas publicaciones resulta sensiblemente inferior a la encontrada en nuestro estudio: 0,4% en Uruguay, 0,2% en Chile, 1,8% en Argentina, 2,27% en Bolivia y 3,15% en Paraguay, si bien algunos estudios localizados constatan la gran variabilidad que puede existir en diferentes zonas de países como Brasil, donde se señalan prevalencias del 0,06% en el sur del país (Aznar y cols., 2014), 7,7% al suroeste (de Alencar Mota y cols., 2016) y 10,20% en el medio oeste (Aznar et al. 2014).

En las figuras R1 y R2 se observa que Manabí es la provincia que registra mayor seropositividad a nivel individual como de rebaño. Las provincias de la sierra, Azuay y Pichincha presentan también mayor seropositividad a nivel individual y de rebaño respectivamente. Estas tres provincias se caracterizan porque concentran el mayor número de animales, tienen la mayor producción de leche a la vez que se observa mayor movilidad del ganado debido a la comercialización que existe en estas zonas.

Respecto a las variables incluidas en el modelo multivariable (tabla R 15), la primera variable incluida fue el sexo. Las hembras presentaron mayor prevalencia, lo cual se comprende debido a las condiciones favorables para el crecimiento y permanencia de la bacteria en el tracto reproductivo, en especial en el útero grávido (Tesfaye y cols., 2011). Las células de la placenta contienen gran cantidad de receptores de manosa a los que se adhieren este tipo de moléculas presentes en el extremo terminal del LPS de *Brucella*; a ello se suma el tropismo por el eritritol

placentario bovino que promueve el crecimiento de *B. abortus* (Rivers y cols., 2006; Olsen y Tatum, 2010) y consecuentemente la proliferación en los trofoblastos de la placenta que rodean al feto ocasionando una infección crónica, placentitis, muerte fetal y aborto (Poester y cols., 2013). En este sentido las hembras infectadas eliminan grandes cantidades de *Brucella* durante el parto o en el aborto constituyéndose en la principal fuente de infección y responsable del mantenimiento de la enfermedad en el rebaño. El hecho de que usualmente en los rebaños se separen los machos de las hembras puede también contribuir a la prevalencia significativamente mayor encontrada en las hembras.

Con respecto a la aptitud de la granja, los rebaños destinados a producción de leche presentaron una prevalencia mayor que los rebaños destinados a producción mixta (carne – leche). En Ecuador es una práctica común el manejo extensivo a través del pastoreo diario en pequeñas extensiones o por “sogueo”, práctica en la que el animal se mantiene atado por medio de una cuerda al suelo del pastizal y consume el alimento de una extensión no mayor a 1,5 metros. Este práctica de manejo determina que los animales pasen la mayor parte del tiempo en el pastizal y se los reúna diariamente en pequeñas áreas para realizar el ordeño o para acceder a las fuentes de agua. Consecuentemente, el aborto se produce en las zonas de pastoreo incrementando el acceso de los animales al forraje y agua contaminados, así como el riesgo de contacto entre los animales infectados y sanos. Este sistema de manejo podría conducir al aumento de la prevalencia que se da en los rebaños de producción de leche. Es conocido que el riesgo para la transmisión de *Brucella* se reduce en sistemas de manejo extensivo por la baja densidad de animales en el área y menores probabilidades de contacto entre los animales (Moreno, 2002); sin embargo, como reporta Aparicio (2013), el hecho de que las vacas lecheras tengan mayor incidencia de la enfermedad viene determinado por la convivencia cercana entre los animales, que se favorece en este tipo de explotación.

En cuanto a la presencia de instalaciones (establos, salas de ordeño, mangas de manejo, etc.) como factor de riesgo, su inclusión se justifica por el mayor

contacto que presentan los animales al ser introducidos en este tipo de explotaciones, lo que incrementaría las posibilidades de contagio.

La siguiente variable del modelo fue la alimentación *ad libitum*. De acuerdo a las características de manejo de los rebaños en Ecuador, la alimentación disponible de forma permanente es la que obtienen los animales mediante pastoreo, tratándose en Ecuador, en su mayoría, de pastizales viejos que se mantienen con fertilización orgánica e inorgánica; este tipo de manejo se ve alterado con la estación seca y la ausencia de sistemas de riego que impiden una recuperación adecuada de los pastizales, por lo que el valor nutritivo que aporta a los animales es bajo. Además, la suplementación con pienso, minerales o vitaminas es una práctica inusual y suele ser frecuente encontrar animales en estado de desnutrición. Martin y cols. (2008) reportaron la reducción de la respuesta inmune durante periodos de restricción de alimento, mientras que (Beldomenico y Begon, 2010) establecieron que los individuos en condiciones nutricionales deficientes pueden ser más susceptibles a las infecciones, agravando aún más su condición y aumentando el riesgo de sufrir nuevas infecciones, lo que explicaría el por qué la *alimentación ad libitum* se correlaciona con una menor prevalencia. Los animales malnutridos infectados, constituirían además una nueva fuente infección dentro de la población, propiciando un mayor contagio.

La edad es un factor de riesgo relacionado con el hospedador (Chand y Chhabra 2013,) y diversos autores han señalado su asociación con la presencia de brucelosis bovina (Boukary y cols., 2013; Mugizi y cols., 2015). En este sentido, en diversos estudios se describe una mayor seropositividad en los bovinos adultos respecto a los jóvenes (Asmare y cols., 2010; Chand y Chhabra, 2013; Dirar, Nasinyama y Gelalcha, 2015; Ali y cols., 2017). Por otra parte la madurez sexual supone un determinante importante de la enfermedad, es decir, los animales sexualmente inmaduros son menos sensibles a la brucelosis (Radostits y cols., 2000).

En referencia a la pendiente media de la granja, se encontró que la seropositividad de *Brucella* aumentó en las granjas ubicadas en terrenos que

presentaron un mayor desnivel. Esta variable se ha señalado previamente como factor de riesgo para la infección por el Herpesvirus Bovino 1 en Ecuador (Carbonero y cols., 2011). La pendiente media de la finca fue estimada midiendo diferentes puntos tomados al azar en la finca. En alrededor del 25% de las explotaciones se observaron pendientes medias superiores al 30%. El gran esfuerzo continuo que los animales que viven en estas granjas necesitan hacer, junto con una dieta pobre, podría afectar al sistema inmune, predisponiendo a los animales a las formas clínicas, y con ello, a una mayor eliminación y contagio del agente.

De acuerdo al modelo se identificó una asociación directa entre el aborto y la seropositividad de *Brucella*. En bovinos es sobradamente conocido el papel que tiene este agente como causante de problemas reproductivos como abortos, nacimiento de terneros débiles o infertilidad (de Alencar Mota y cols., 2016), siendo el aborto el signo más común de la enfermedad en bovinos (Ali y cols., 2017). Los animales infectados excretan gran cantidad de bacterias a través de los fetos, placentas y secreciones que contaminan el entorno y lo constituyen en una fuente de infección para los hospedadores susceptibles (Castro y cols., 2005; Olsen y Tatum, 2010).

Coxiella burnetii

A nivel de América del Sur se han realizado pocos estudios sobre la presencia de *C. burnetii*, estando la mayor parte relacionados con casos en la población humana. Un estudio realizado en Colombia en el año 1977 señala una prevalencia del 25% en bovinos (Ruiz, 1977). Por otra parte, en Chile, en el año 2003 se halló un 14% de prevalencia en un rebaño ovino importado, estudiado por su implicación en un brote de Fiebre Q en el personal de una Estación Cuarentenaria Pecuaria (González y Moreira, 2003). Así mismo, se realizó otro estudio en ganado caprino de Venezuela donde se halló una prevalencia del 60,63% (Oropeza y cols., 2010). Esta falta de estudios a nivel de la región puede determinar que se trate de una infección y enfermedad subdiagnosticadas, con las repercusiones subsecuentes que de ello pueda derivar sobre la salud animal y

humana. Este ha sido el primer estudio que se ha realizado en ganado bovino sobre este agente en Ecuador.

La prevalencia individual que hemos encontrado (12,6%) se ubica dentro de los valores reportados a nivel mundial, que oscilan desde el 0,6% en Australia (Banazis y cols., 2010) al 46,6% en Japón (Guatteo y cols., 2011). En países tan diversos como Dinamarca (Paul y cols., 2014) o Corea del Sur (Lyo y cols., 2017) se han observado prevalencias similares a las determinadas en nuestro estudio (9,1 y 10,5%, respectivamente).

La dispersión obtenida fue del 46,9%, valor que también se encuentra entre los datos publicados a nivel mundial. Así, Polonia registra el 0,6% y Alemania el 17,7%, en contraste con Suecia y Dinamarca que reportan el 61,4% y 75%, respectivamente (EFSA, European Food Safety Authority, and ECDC y cols., 2012). En Canadá, la prevalencia alcanza el 67% mientras que en Estados Unidos se describen prevalencias comprendidas entre el 1% y el 73% (McCaughey y cols., 2010). Los valores de la prevalencia intrarrebaño en nuestro estudio oscilaron entre el 8% a 100% (media: 25.0%; Q1: 12.5%, Q2: 25.0%, Q3: 37.5%), valores similares a los señalados por Guatteo y cols. (2011) al realizar el análisis de varios estudios de prevalencia (media: 26.3%, Q1:21.8%, Q3: 38.2%). Al comparar las figuras R3 y R4 se puede observar la similitud en la distribución de la seropositividad individual y a nivel de rebaño, destacándose los mayores niveles en las provincias ubicadas en la sierra norte y en la provincia costera de Manabí.

Con respecto a los factores relacionados con la seropositividad de *C. burnetii* (tabla R.16), se señala la mayor edad de los bovinos como un factor de riesgo en la seroprevalencia de *C. burnetii*, resultado que coincide con los encontrados por otros autores (Alvarez y cols., 2012; Mazeri y cols., 2012; Paul y cols., 2012). La explicación para esta observación se justifica, al igual que en otros agentes infecciosos, con que la probabilidad de la exposición a la bacteria aumenta con la edad (McCaughey y cols., 2010; Ruiz-Fons y cols., 2010; Garcia-Ispierto y cols., 2011; Paul y cols., 2014), uniéndose a ello la capacidad de *C. burnetii* para causar infecciones persistentes durante toda la vida del animal (Böttcher y cols., 2011).

La alimentación de terneros con sustitutos de leche se asoció significativamente con una mayor seropositividad de *C. burnetii* en el modelo GEE. Este resultado podría explicarse debido a las condiciones de manipulación al preparar los sustitutos de la leche materna. En este sentido, los baldes y otros fómites e incluso el agua que se utiliza para reconstituir el producto podría contribuir a la transmisión indirecta entre los terneros si no se limpian y desinfectan profundamente, algo común en las granjas ecuatorianas. Otra posible explicación estaría relacionada con el reducido valor nutricional de los sustitutos de leche de baja calidad (frecuentemente utilizados en Ecuador) comparado con la leche materna.

Se observó una asociación entre las seropositividades de *C. burnetii* y del Virus Respiratorio Sincitial Bovino. La presencia de los dos agentes se ha descrito en el tracto respiratorio inferior bovino (Brodersen, 2010; Knobel y cols., 2013) y en un estudio serológico realizado en bovinos del trópico de México (Barajas Rojas, 1998). Aunque la dirección de esta asociación no está clara, el Virus Respiratorio Sincitial Bovino podría causar inmunosupresión (Woldehiwet y Sharma, 1992), sugiriéndose por tanto que la infección por este virus sería un factor predisponente para la infección por *C. burnetii*.

No han encontrado estudios previos que describan la relación entre la desinfección del cordón umbilical y la seropositividad de *C. burnetii*. El resultado obtenido sugiere que el cordón umbilical podría ser una posible vía de transmisión para *C. burnetii*, una posibilidad real en un país donde la limpieza del área de partos no es frecuente. Además, la forma resistente de *C. burnetii* puede sobrevivir durante largos períodos, contaminando así el cordón umbilical al nacer.

El hecho de que el estudio se haya realizado en rebaños bovinos caracterizados por su baja producción y deficientes condiciones técnicas y de manejo agrega valor a este trabajo y muy probablemente explica por qué los factores de riesgo identificados aquí son diferentes de los encontrados en otros estudios de países industrializados. Factores tales como la cuarentena de los

animales recién comprados o la aplicación de prácticas de higiene o de bioseguridad adoptadas por los veterinarios antes de entrar en el establo se han descrito previamente como asociados con la protección frente a la infección por *C. burnetii* (Paul y cols., 2012); sin embargo no fueron identificados en el presente estudio, muy probablemente debido a las bajas frecuencias de estas prácticas en Ecuador. No se evaluó el uso compartido de máquinas entre las granjas (Agger y cols., 2013) o la trashumancia de ganado vacuno (Mazeri y cols., 2012) debido a que estas prácticas no se realizan en los sistemas de producción ganadero en Ecuador.

***Leptospira interrogans* serovar Hardjo.**

La leptospirosis bovina se encuentra ampliamente diseminada a nivel mundial con prevalencias muy variables que van desde el 0,8% en Canadá (Van De Weyer y cols., 2011) al 91% en Chile (Salgado y cols., 2015). Ecuador no está exento de esta realidad, ubicándose la prevalencia individual (13,7%) entre los valores descritos. Dicha prevalencia resulta sensiblemente inferior a la descrita en otros países sudamericanos, como Brasil (65,5%) (Chiebao y cols., 2015), Colombia (60,9%) (Ochoa y cols., 2000), Venezuela (51,84%) (Gonzalez Gontafalla y Rivera Pirela, 2015) o la previamente mencionada de Chile.

La dispersión de nuestro estudio (42%), resulta similar a la descrita en países tan dispares como España (42,8%) (Alonso-Andicoberry y cols., 2001) o Bangladesh (47,27%) (Parvez y cols., 2015). Al igual que sucediera con la prevalencia individual, la dispersión hallada es inferior a la observada en otros países del entorno geográfico como Brasil (89,7%) (Pimenta y cols., 2014) y 98,8% (Chiebao y cols., 2015), Chile (75%) (Salgado y cols., 2014) o Venezuela (80,51%) (Gonzalez Gontafalla y Rivera Pirela, 2015). En contraste, en Colombia se ha descrito una menor dispersión (21,7%) (Hernández-Rodríguez y cols., 2011).

Al observar las figuras R5 y R6 la mayor prevalencia tanto individual como del rebaño se observa en las provincias de Pichincha, Manabí y Santo Domingo; las dos últimas provincias y algunas zonas de la provincia de Pichincha se caracterizan

en su mayor parte por ser zonas de clima cálido y húmedo; al igual que en otras provincias del país, el sistema de manejo generalmente es extensivo y una característica importante en estas tres provincias es la alta movilidad de los animales por el comercio existente. Estas condiciones se han presentado en varios estudios como factores asociados a la supervivencia de las leptospiras y a la transmisión de la enfermedad (Hernández-Rodríguez y cols., 2011; Salgado y cols., 2014, 2015; Chiebao y cols., 2015; Fávero y cols., 2017)

En relación al modelo GEE (tabla R.17), la cama de viruta constituye un factor de riesgo para la seropositividad de *Leptospira* Hardjo en los rebaños bovinos de producción láctea y mixta de Ecuador, factor que se explicaría por la mayor supervivencia ambiental que esta bacteria presentaría en este tipo de sustrato tras una contaminación procedente por lo general de la orina de los animales infectados. El papel de la orina en la transmisión de la leptospirosis está ampliamente documentado (Levett, 2004; Lilenbaum y Martins, 2014). La cama de viruta se mantiene en los establos durante períodos de tiempo prolongados, acumulando orina y otros desechos orgánicos. Se ha descrito que en las condiciones adecuadas de temperatura y humedad las leptospiras pueden sobrevivir durante varios días e incluso algunas semanas (Acha y Szyfres, 2001; Alonso-Andicoberry y cols., 2001; Bolin, 2003).

La desparasitación de terneros también ha sido incluida en el modelo como un factor de riesgo, probablemente relacionado con las condiciones de higiene inadecuada de este tipo de actividades (principalmente, la ausencia de reemplazo de agujas entre animales e incluso rebaños), que propiciarían un contagio percutáneo (Carbonero y cols., 2015). Por otra parte, está sobradamente demostrado que es precisamente la percutánea la principal vía de contagio de la leptospirosis (Levett, 2004; Adler, 2014).

Se ha encontrado una asociación entre las seropositividades de *C. burnetii* y *L. interrogans* serovar Hardjo. Aunque las asociaciones entre los agentes incluidos en esta tesis se discutirán al final de la discusión, consideramos relevante desarrollar esta asociación al formar parte del modelo GEE. Existen estudios previos donde se ha

descrito la presencia conjunta de los dos agentes (Mazeri y cols., 2012; Vongxay y cols., 2012). Es posible que una primera infección con *C. burnetii* debilite la respuesta inmunológica del animal haciéndolo más susceptible a la infección con *L. interrogans* serovar Hardjo. *C. burnetii* tiene un ciclo de vida intracelular obligatorio y posee un sistema de secreción tipo IV, creyéndose que durante la replicación en las células fagocíticas del hospedador, *C. burnetii* modifica la respuesta inmune del huésped (Ghigo y cols., 2009; Bewley, 2013), lo que apoyaría nuestra explicación.

La presencia de pediluvios en las granjas es otro factor de riesgo para la seropositividad de *L. interrogans* serovar Hardjo en los rebaños bovinos en estudio. Esta bacteria puede sobrevivir en el medio ambiente durante largos periodos de tiempo, especialmente en el principal hábitat natural del microorganismo que es el acuático y, más concretamente, las aguas superficiales (Acha y Szyfres, 2001; Xue, Yan y Picardeau, 2009). Resulta sumamente frecuente en las explotaciones ecuatorianas que no se realice un correcto manejo de los pediluvios, apenas realizándose reposición de los desinfectantes. Así, la posibilidad de que orina contaminada con leptospiras procedente de los bovinos, e incluso de roedores, contamine estos pediluvios, ya sin poder desinfectante alguno, sería altamente plausible, perdiendo su papel profiláctico para convertirse en una fuente de infección. El contacto de los animales con agua contaminada es un factor de riesgo ampliamente reconocido para la transmisión y permanencia de la enfermedad en un rebaño (Ghigo y cols., 2009; Adler y Moctezuma, 2010; Martins y Lilenbaum,

La siguiente variable incluida en el modelo fue la estación húmeda. En la variable anterior ya hemos resaltado el papel fundamental que juegan los ambientes acuáticos en la supervivencia y difusión de este tipo de bacterias. No sorprende, en consecuencia, el hecho de que hayamos observado un incremento significativo de la prevalencia durante la estación húmeda. Otros autores han señalado previamente un incremento de los casos clínicos acontecido durante la época lluviosa (Acha and Szyfres, 2001; Parvez y cols., 2015).

Al igual que en los modelos anteriores, la edad también ha sido incluida como factor de riesgo en el modelo de *Leptospira*. Consideramos que las razones argumentadas para los agentes anteriores, también de etiología bacteriana, siguen siendo válidas para esta bacteria: mayor tiempo de exposición (Van Do Weyer y cols., 2011; Mughini-Gras y cols., 2014). Otros autores han observado previamente una asociación entre la edad y la infección con *Leptospira* (Schoonman y Swai, 2010; dos Santos y cols., 2012).

El sexo fue otra variable relacionada con el hospedador incluida en el modelo, presentando las hembras mayor seropositividad frente a *L. interrogans* serovar Hardjo. Ramirez y Rivera (1999) señalaron que las hembras están sometidas a un mayor riesgo de exposición a *Leptospira* debido al manejo a distintos condicionantes como el parto o el ordeño, que propiciarían la transmisión principalmente por vía percutánea (microheridas en los pezones, prolapsos, dilatación del aparato reproductivo, etc.). Además, se debe considerar que estos animales pueden estar inmunocomprometidos por el estrés causado por la desnutrición, parto y/o lactancia (Woodford, 2009), aumentando por ello su susceptibilidad a la infección.

A diferencia de los factores anteriormente descritos, la desinfección del cordón umbilical se ha incluido en el modelo como un factor de protección. Esta práctica de manejo impide la entrada de bacterias a través del cordón umbilical después del nacimiento (Sigurdson, y cols., 2004; Carbonero y cols., 2015).

***Neospora caninum*.**

Este agente, el único de etiología parasitaria incluido en nuestro estudio, se encuentra distribuido a nivel mundial, siendo considerado uno de los principales patógenos reproductivos. En América Latina se ha descrito su presencia en Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela (Osawa y cols., 2002; Moore, 2005; Romero y cols., 2005; Bañales y cols., 2006; Lista-Alves y cols., 2006; Bruhn y cols., 2013). En el presente estudio, ha sido el agente que ha presentado una mayor prevalencia (33,2%) en las granjas de ganado lechero y de doble propósito de Ecuador. La seropositividad observada se sitúa dentro del

rango de valores descrito por otros autores en Sudamérica, habiéndose realizado estudios en Brasil (14.7%) (Chiebao y cols., 2015), Venezuela (17,23%) (Suárez y Maldonado, 2012). Argentina (20,3%) (Fort y cols., 2015), Uruguay (28,8%) (Furtado y cols., 2011), Paraguay (29,8%) (Osawa y cols., 2002) y Colombia (45%) (Medellín, Anaya and Becerra, 2017). Con respecto a la dispersión, el valor obtenido 78,2% resulta notablemente elevado y similar a las dispersiones reportadas en Uruguay (73,8%) (Bañales y cols., 2006), Brasil (87.4%) (Chiebao y cols., 2015) y Venezuela (91,94%) (Suárez y Maldonado, 2012).

Al observar las figuras R7 y R8 se evidencia que *N. caninum* se encuentra ampliamente distribuida en los rebaños bovinos de Ecuador. En las provincias del sur y centro de la serranía ecuatoriana se observan las prevalencias más altas a nivel individual al igual que en la provincia costera de Manabí. Por otra parte, la dispersión de *N. caninum* es elevada en todas las provincias en estudio, siendo aún más relevante en Azuay, Zamora Chinchipe, Cotopaxi, Tungurahua y Manabí; estas provincias pertenecen a las tres regiones geográficas del país: sierra, costa y oriente.

A continuación se describen las variables asociadas a la seropositividad de *N. caninum*, expuestas en la tabla R 18.

La edad de los animales, en concreto a partir de 48 meses de vida (valor de la mediana de la variable), supuso un factor de riesgo en el modelo GEE. En el mismo sentido que sucediera en los modelos anteriores, la mayor edad supone un factor de riesgo por el mayor tiempo que tienen los animales para infectarse, máxime considerando que las infecciones por este agente se prolongan durante toda la vida del animal (Bartels y cols., 2006; Dubey y cols., 2007). En Ecuador, es común encontrar en los rebaños de producción láctea animales que superan los 8 - 10 o más años de edad en las granjas. La permanencia de los animales adultos en la granja está supeditada al sacrificio o venta de estos animales como fuente eventual de ingreso económico o por enfermedad.

Otro factor asociado con la seropositividad a *N. caninum* es la reposición externa, hallazgo similar al descrito por (Beck y cols., 2010; Asmare y cols., 2013).

La reposición de animales en las granjas se realiza ocasionalmente, siendo más frecuente la compra de terneros muy jóvenes o adultos ya entrados en fase de declive productivo debido a su menor precio. Por otra parte, la compra de estos animales se realiza sin una certificación sanitaria que valide el ingreso de animales sanos a la granja. En consecuencia, la reposición con animales infectados provenientes de fuentes externas podría contribuir a la introducción de la infección en la granja. Otros autores han descrito que una buena política de reposición puede contribuir a disminuir la prevalencia de *Neospora*, al reponer de explotaciones certificadas como libres y realizar un desvieje selectivo de animales positivos (Barling y cols., 2001; Dubey y cols., 2007). Sin embargo, como ya se ha mencionado, este tipo de práctica es marcadamente infrecuente en Ecuador.

Un número menor de terneros en la granja se asoció en el modelo como factor de riesgo para la seropositividad de *Neospora caninum*. Resulta una práctica habitual que los individuos en esta etapa inicial se mantengan durante varias semanas cerca de la casa del cuidador o del ganadero, precisamente los lugares en los que con mayor frecuencia deambulan los perros. Estos animales son parte fundamental (e imprescindible) del ciclo vital de *N. caninum*, siendo sus hospedadores definitivos de *N. caninum*. La eliminación de ooquistes a través de las heces caninas se produce de forma intermitente, contaminando las áreas o instalaciones para la alimentación del ganado (Basso y cols., 2010). Un estudio realizado en un rebaño afectado por una infección postnatal reciente relacionó la seropositividad frente a *N. caninum* con la vivienda común de los animales, determinando la estrecha relación de la infección con el área de alimentación (Dubey y cols., 2007).

La variable rumiantes salvajes fue el último de los factores de riesgo incluido en el modelo. Algunos autores han señalado la infección por *N. caninum* en rumiantes salvajes (Bregoli y cols., 2006; Almería y cols., 2007; Panadero y cols., 2010; García-Bocanegra y cols., 2012). Si bien aún no ha podido ser demostrada la existencia de un ciclo silvestre o selvático de *N. caninum*, estos hallazgos apoyarían la explicación de que realmente existe en Ecuador una interrelación entre el ganado bovino y los rumiantes salvajes en el ciclo de *Neospora*, tal y como sugieren

nuestros resultados. Observaciones similares han sido señaladas en otros estudios acerca de este agente en el ganado bovino (Almería y López-Gatius, 2013). La presencia de rumiantes salvajes en las áreas de pastoreo resulta frecuente en Ecuador, especialmente en las granjas que están cerca o dentro de las zonas de amortiguamiento de áreas protegidas.

Asociación de agentes

Al analizar las tablas R19 y R20, se observa una asociación entre la seropositividad de todas las infecciones de etiología bacteriana ($p < 0,001$). Es importante resaltar el hecho de que las asociaciones, en todos los casos, poseen un sentido positivo (cuando se incrementa la seroprevalencia para un agente, también aumenta para otro). En contraste, no se han hallado asociaciones significativas entre ninguno de los agentes bacterianos y *Neospora caninum* (tabla R20).

Al respecto, todos los agentes bacterianos son Gram negativos con una estructura similar en los LPS de su pared bacteriana y, al igual que *Neospora caninum* poseen condicionantes comunes en su transmisión tales como la edad, mal manejo, deficientes medidas higiénicas entre otros; estos son factores que condicionan la entrada de un agente y como los mecanismos de transmisión son similares, también van a condicionar la entrada de los otros agentes; al estar correlacionados es normal que si se incrementa la probabilidad de transmisión de un agente incremente la probabilidad de transmisión de otro.

Podría sugerirse la existencia de variables confundentes, sin embargo la única variable que ha salido común a todos los modelos es la edad; sin embargo, no parece que esta sea variable confundente porque siendo común a *Neospora*, no existe asociatividad entre los agentes bacterianos y *Neospora*.

Plan de lucha

En Ecuador no existen programas oficiales de control frente a la leptospirosis, fiebre Q y neosporosis en los animales, no habiéndose realizados estudios epidemiológicos previos acerca de dichas enfermedades ni de los agentes etiológicos que las originan. Se encuentra en vigencia el Plan Nacional contra la

Brucelosis Bovina, si bien su carácter voluntario hace que apenas tenga seguimiento en el país. La certificación zoosanitaria de importación incluye a la leptospirosis, brucelosis y neosporosis como enfermedades de interés cuarentenario (AGROCALIDAD 2012); sin embargo, sólo están consideradas enfermedades de notificación obligatoria la brucelosis y la fiebre Q (AGROCALIDAD 2013).

Resulta preciso el diseño y aplicación de programas de control basados principalmente en:

- 1) el conocimiento de la enfermedad por parte del ganadero y del personal relacionado con esta actividad productiva.
- 2) la mejora de las condiciones y prácticas de manejo sanitario y reproductivo.
- 3) la realización de estudios epidemiológicos previos que permitan clasificar los rebaños según se encuentren o no infectados.
- 4) la vacunación como práctica habitual.

De acuerdo a los modelos epidemiológicos obtenidos en este estudio se exponen a continuación algunas recomendaciones a considerar dentro del diseño y aplicación de programas de control de las infecciones de los agentes estudiados.

- a) Implementar medidas de bioseguridad acordes a las condiciones propias de cada explotación o granja; estas medidas permitirán minimizar el riesgo de introducción de los agentes infecciosos y prevenir la propagación de la infección dentro y fuera del rebaño.
- b) Eliminación adecuada de tejidos y residuos de abortos o del parto. Es necesario que se mantengan a los animales que están próximos al parto en lugares e instalaciones que permitan la limpieza y desinfección.
- c) Realizar la reposición de animales considerando el ingreso de nuevos animales con la correspondiente certificación sanitaria. Es conveniente

que se utilice como criterio para el desvieje los animales positivos a los diferentes agentes infecciosos.

- d) Mejorar las prácticas con respecto al manejo de la alimentación: preparación adecuada de los sustitutos de leche, mantenimiento de concentrados y forraje aislados de posibles fuentes de contaminación, como roedores o perros.
- e) Realizar la limpieza y desinfección permanente de las instalaciones; de acuerdo a los factores de riesgo determinados sería necesario el cambio periódico de la cama de los establos, así como del agua y desinfectantes que se mantiene en los pediluvios.
- f) Mantener en buen estado las cercas que delimitan las explotaciones de manera que se evite el acceso de animales silvestres a las zonas de pastoreo.

Las acciones dirigidas al control de las enfermedades en los animales se traducen no solo en la mejora de la salud de los animales y productividad de las explotaciones, sino también en la disminución del riesgo de infección para los seres humanos en el caso de las enfermedades zoonóticas.

VII CONCLUSIONES

1. Las infecciones bovinas que potencialmente pueden ocasionar trastornos de tipo reproductivo se encuentran ampliamente distribuidas en Ecuador, habiéndose encontrado cada una de las infecciones en todas las regiones estudiadas. Se observó una dispersión, para todos los agentes estudiados, superior al 40 por ciento. Mención especial merece el caso de *Neospora caninum*, agente para el que este valor alcanzó casi el 80 por ciento.
2. En relación a la prevalencia individual, si bien sus valores resultan lógicamente inferiores a los anteriores, presentan unos niveles considerables que oscilan desde el 12,6% para *Coxiella burnetii* hasta el 33,2% para *Neospora caninum*.
3. La seropositividad intrarrebaño mostró una enorme variabilidad entre los distintos rebaños, alcanzando para todos los agentes un valor máximo del 100%, siendo el valor mínimo bastante uniforme entre las infecciones estudiadas (8-12,5%), si bien este valor mínimo está fuertemente influido por el número de animales muestreados en cada explotación. Atendiendo a la prevalencia media intrarrebaño se puede concluir que *Neospora caninum* presenta una mayor contagiosidad (42,3%), situándose *C. burnetii* en el extremo opuesto (25%).
4. Respecto a las infecciones mixtas, se observa que ocurren con una elevada frecuencia, estando significativamente asociadas las existentes entre agentes de tipo bacteriano. En contraste, no existe ninguna asociación significativa de *N. caninum* con el resto de agentes bacterianos.
5. Han sido identificados como factores de riesgo para la infección por especies pertenecientes al género *Brucella* el sexo hembra, la aptitud láctea, la existencia de instalaciones en la explotación, la alimentación *ad libitum*, así como una mayor edad, pendiente media de la granja y tasa media anual de abortos.
6. Se encuentran significativamente asociadas con la infección por *Coxiella burnetii*, incluyéndose en su modelo multivariable, la alimentación de los

terneros con sustitutos lácteos, la seropositividad frente al Virus Respiratorio Sincitial Bovino, la desinfección del cordón umbilical, que actúa como un factor de protección, y la edad, presentando los animales mayores un incremento de la seropositividad.

7. En cuanto a la infección por *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, componen su modelo multivariable las siguientes variables: la cama de viruta, la desparasitación de terneros, la seropositividad frente a *C. burnetii*, la existencia de pediluvios, la edad, el sexo hembra, la estación húmeda y la desinfección del cordón umbilical.
8. Finalmente, han sido incluidos como factores de riesgo para la infección por *Neospora caninum* una edad superior a 48 meses, la reposición externa, un número de terneros inferior a nueve y la presencia de rumiantes salvajes en los alrededores de la explotación.

VIII RESUMEN

Se ha realizado un estudio epidemiológico para determinar la seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la infección por *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo y *Neospora caninum* en rebaños bovinos de producción láctea y mixta de Ecuador. Un total de 2.668 muestras de suero de 386 rebaños se analizaron mediante kits comerciales de ELISA, cumplimentándose además en cada explotación una encuesta epidemiológica que incluyó un total de 71 variables relacionadas con el manejo, la alimentación, las instalaciones, la bioseguridad y la sanidad animal. Con el fin de determinar las variables asociadas a las distintas infecciones como factores de riesgo se desarrollaron modelos GEE (Generalized Estimating Equations model).

La prevalencia real obtenida para *Brucella*, *C. burnetii*, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo y *N. caninum* fue de 17,0%, 12,6%, 13,7% y 33,2%, respectivamente; asimismo, se identificó una dispersión para estos agentes del 45,1%, 46,9%, 42,0% y 78,2%, respectivamente. La prevalencia intrarrebaño en el caso de *Brucella* estuvo comprendida entre el 10-100% (media: 38,9%); para *Coxiella burnetii* estos límites tomaron un valor desde el 8% al 100% (media: 25,0%); siendo para *Leptospira* serovar Hardjo del 12,5% al 100% (media: 36,46%) y, finalmente, para *Neospora caninum*, su rango osciló entre el 9 y el 100% (media: 42,3%).

En el modelo GEE para la seropositividad de *Brucella* se incluyeron siete variables: las variables cualitativas sexo hembra (OR: 2,03; IC95%: 1,32-3,13), tipo de explotación (lechera) (OR: 1,79; IC95%: 1,11-27 2,87), presencia de instalaciones en la granja (OR: 1,80; IC95%: 1,19-2,74), alimentación *ad libitum* (OR: 0,32; IC95%: 0,19-0,54); y las variables cuantitativas edad (OR: 1,005; IC95%: 1,00-1,02), pendiente media en la granja (%) (OR: 1,013; IC95%: 1,00-1,03) y porcentaje anual de abortos (OR: 1,016; IC95%: 1,00-1,03).

Cuatro factores se incluyeron en el modelo GEE para la seropositividad de *C. burnetii*: edad del ganado bovino (OR: 1,01; IC95%: 1,016-1,014), alimentación de terneros con sustitutos de leche (OR: 1,94; IC95%: 1,1-3,3), seropositividad frente

al virus respiratorio sincitial bovino (OR: 1,54; IC95%: 1,1-2,3) y la desinfección del cordón umbilical (OR: 0,60; IC95%: 0,4-0,9).

Respecto a de *L. interrogans* serovar Hardjo, actuaron como factores de riesgo las camas de viruta (OR: 9,15; IC95%: 1,73-48,30), la desparasitación de terneros (OR: 1,59; IC95%: 1,03-2,46), la seropositividad frente a *C. burnetii* (OR: 1,42; IC95%: 1,06-1,90), la existencia de pediluvios (OR: 8,40; IC95%: 1,23-57,57), la edad (OR: 1,00; IC95%: 1,00-1,01), el sexo hembra (OR: 1,46; IC95%: 1,01-2,12) y la estación húmeda (OR: 2,85; IC95%: 1,47-5,53), actuando la desinfección del cordón umbilical como factor de protección (OR: 0,43; IC95%: 0,27-0,68).

Finalmente, en el modelo GEE obtenido para la seropositividad de *N. caninum* se identificaron factores de riesgo: una edad superior a 48 meses (OR: 1,27; IC95%: 1,07-1,53), la reposición externa (OR: 1,32; IC95%: 1,09-1,60), un número de terneros inferior a nueve (OR: 1,39; IC95%: 1,11-1,72) y la presencia de rumiantes salvajes en las áreas circundantes de la explotación (OR: 1,36; IC95%: 1,08-1,73).

IX SUMMARY

An epidemiological study was carried out to determine the seroprevalence and risk factors associated with *Brucella* spp., *Coxiella burnetii*, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo and *Neospora caninum* in dairy and mixed (dairy-beef) herds from Ecuador. A total of 2,668 serum samples from 386 herds were analyzed using commercial ELISA kits. In addition, an epidemiological questionnaire, which included a total of 71 variables related to management, food, facilities, biosafety and animal health, was filled out in every farm. Generalized Estimating Equations models (GEE) were developed in order to determine the variables associated as risk factors for every infection.

The real prevalence observed for *Brucella*, *C. burnetii*, *Leptospira interrogans* serovar Hardjo and *N. caninum* was 17.0%, 12.6%, 13.7% and 33.2%, respectively. In reference to the herd prevalence, it reached the next values: 45.1%, 46.9%, 42.0% and 78.2%, respectively. On the other hand, the within-herd prevalence ranged between 10 and 100% (mean: 38.9%) for *Brucella* spp.; from 8% to 100% (mean: 25.0%) for *Coxiella burnetii*; from 12.5% to 100% (mean: 36.46%) for *Leptospira* serovar Hardjo and, finally, from 9 to 100% (mean: 42.3%) for *Neospora caninum*.

The GEE model for *Brucella* seropositivity included seven variables: the nominal variables female sex (OR: 1.79; 95% CI: 1.32-3.13), type of herd (dairy) (OR: 1.80; 95% CI: 1.19-2.74), the existence of farm facilities (OR: 1.80; 95% CI: 1.19-2.74), *ad libitum* feeding (OR: 0.32; 95% CI: 0.19-0.54); and the quantitative variables: age of cattle (OR: 1.005; 95% CI: 1.00-1.02), mean farm slope (%) (OR: 1.013; 95% CI: 1.00-1.03) and annual abortions rate (OR: 1.016; 95% CI: 1.00-1.03).

Four factors were included in the GEE model for the seropositivity of *C. burnetii*: age of cattle (OR: 1.01; 95% CI: 1.016-1.014), feeding of calves with milk replacers (OR: 1.94; CI: 1.1-2.3), seropositivity to bovine respiratory syncytial virus (OR: 1.54; 95% CI: 1.1-2.3) and disinfection of the umbilical cord (OR: 0.60; 95% CI: 0.4-0.9).

Regarding to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, were identified as risk factors the chip bed (OR: 9.15; 95% CI: 1.73-48.30), the deworming of calves (OR: 1.59; 95% CI: 1.03-2.46), the seropositivity to *C. burnetii* (OR: 1.42; 95% CI: 1.06-1.90), (OR: 8.40; 95% CI: 1.23-57.57), age (OR: 1.00; 95% CI: 1.00-1.01), the female sex (OR: 1.46; 95% CI: 1.01-2.12) and the wet season (OR: 2.85; 95% CI: 1.47-5.53). The disinfection of the umbilical cord was determined as protective factor (OR: 0.43; 95% CI: 0.27-0.68).

Finally, in the GEE model obtained for the seropositivity of *N. caninum*, four risk factors were observed: cattle age over 48 months (OR: 1.27; 95% CI: 1.07-1.53), the external replacement (OR : 1.95; 95% CI: 1.09-1.60), a number of calves less than nine (OR: 1.39; 95% CI: 1.11-1.72) and the presence of wild ruminants around the farm (OR: 1.36; 95% CI: 1.08-1.73).

XI BIBLIOGRAFÍA

- Acha, N.P. and Szyfres, B. (2003) 'Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals'. Edited by P. A. H. O. (PAHO). Washington, DC.
- Acha, P. N. and Szyfres, B. (2001) 'Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Volume I. Bacterioses and mycoses', *PAHO Scientific and Technical Publication No. 580*, I(3rd edition), p. 378pp. doi: 10.1590/S1135-57272005000300012.
- Adler, B. (2014) 'Pathogenesis of leptospirosis: Cellular and molecular aspects', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 172(3-4), pp. 353-358. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.06.015.
- Adler, B. (2015) 'History of Leptospirosis and *Leptospira*', in Adler, B. (ed.) *Leptospira and Leptospirosis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 1-9. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8_1.
- Adler, B. and Moctezuma, A. de la P. (2010) '*Leptospira* and Leptospirosis', *Veterinary Parasitology*, 140, pp. 287-296. doi: i:10.1016/j.vetmic.2009.03.012.
- Adler, B., Lo, M., Seemann, T. and Murray, G. L. (2011) 'Pathogenesis of leptospirosis: The influence of genomics', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 153(1-2), pp. 73-81. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.02.055.
- Agger, J. F., Paul, S., Christoffersen, A. and Agerholm, J. S. (2013) 'Risk factors for *Coxiella burnetii* antibodies in bulk tank milk from Danish dairy herds', *Acta Veterinaria Scandinavica*, 55(80), pp. 2-4.
- AGROCALIDAD (2009) 'Programa Nacional de Control de Brucelosis Bovina'. Quito. Ecuador: Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro. Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca., pp. 1-75.
- Alfaro, C., Clavijo, A., Aranguren, Y., de Rolo, M. and Alberto, V. (2007) 'Epidemiología de la leptospirosis en sistemas bovinos doble propósito del estado Monagas', *Zootecnia Tropical*, 25(3), pp. 189-192. Available at: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692007000300006 (Accessed: 27 May 2017).
- Ali, S., Akhter, S., Neubauer, H., Melzer, F., Khan, I., Abatih, E. N., El-Adawy, H., Irfan, M., Muhammad, A., Akbar, M. W., Umar, S., Ali, Q., Iqbal, M. N., Mahmood, A. and Ahmed, H. (2017) 'Seroprevalence and risk factors associated with bovine brucellosis in the Potohar Plateau, Pakistan', *BMC Research Notes*. BioMed Central, 10(1), p. 73. doi:

10.1186/s13104-017-2394-2.

- Aliberti, J. (2005) 'Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma GONDII*', *Nature Reviews Immunology*, 5(2), pp. 162–170. doi: 10.1038/nri1547.
- Almería, S. and López-Gatius, F. (2013) 'Bovine neosporosis: Clinical and practical aspects', *Research in Veterinary Science*, 95(2), pp. 303–309. doi: 10.1016/j.rvsc.2013.04.008.
- Almería, S. and López-Gatius, F. (2015) 'Markers related to the diagnosis and to the risk of abortion in bovine neosporosis', *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 100, pp. 169–175. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.03.022.
- Almería, S., Vidal, D., Ferrer, D., Pabón, M., Fernández-de-Mera, M. I. G., Ruiz-Fons, F., Alzaga, V., Marco, I., Calvete, C., Lavin, S., Gortazar, C., López-Gatius, F. and Dubey, J. P. (2007) 'Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain', *Veterinary Parasitology*, 143(1), pp. 21–28. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.07.027.
- Alonso-Andicoberry, C., García-Peña, F. J. and Ortega-Mora, L. (2001a) 'Epidemiología , diagnóstico y control de la leptospirosis bovina (Revisión)', *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim*, 16(2), pp. 205–225.
- Alonso-Andicoberry, C., García-Peña, F. J., Pereira-Bueno, J., Costas, E. and Ortega-Mora, L. M. (2001) 'Herd-level risk factors associated with *Leptospira* spp. seroprevalence in dairy and beef cattle in Spain', *Preventive Veterinary Medicine*, 52(2), pp. 109–117. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679169>.
- Alvarez, J., Perez, A., Mardones, F. O., Pérez-Sancho, M., García-Seco, T., Pagés, E., Mirat, F., Díaz, R., Carpintero, J. and Domínguez, L. (2012) 'Epidemiological factors associated with the exposure of cattle to *Coxiella burnetii* in the Madrid region of Spain', *Veterinary Journal*. Elsevier Ltd, 194(1), pp. 102–107. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.02.022.
- Anderson, M. L., Palmer, C. W., Thurmond, M. C., Picanso, J. P., Blanchard, P. C., Breitmeyer, R. E., Layton, A. W., McAllister, M., Daft, B. and Kinde, H. (1995) 'Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California.', *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 207(9), pp. 1206–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7559072>.
- Anderson, M., Barr, B., Rowe, J. and Conrad, P. (2011) 'Neosporosis in Dairy Cattle', *Japanese Journal of Veterinary Research*, 60(SUPPL).
- Andoh, M., Zhang, G., Russell-Iodrigue, K. E., Shive, H. R., Weeks, B. R. and Samuel, J. E. (2007) 'T

- Cells Are Essential for Bacterial Clearance , and Gamma Interferon , Tumor Necrosis Factor Alpha , and B Cells Are Crucial for Disease Development in *Coxiella burnetii* Infection in Mice ☒', *Infection and Immunity*, 75(7), pp. 3245–3255. doi: 10.1128/IAI.01767-06.
- Andrianarivo, A. G., Barr, B. C., Anderson, M. L., Rowe, J. D., Packham, A. E., Sverlow, K. W. and Conrad, P. A. (2001) 'Immune responses in pregnant cattle and bovine fetuses following experimental infection with *Neospora caninum*.' , *Parasitology research*, 87(10), pp. 817–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11688887>.
- Angelakis, E. and Raoult, D. (2010) 'Q fever', *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), pp. 297–309. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.07.016.
- Antony, A. and Williamson, N. (2003) 'Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in dogs of rural or urban origin in central New Zealand', *New Zealand Veterinary Journal*, 51(5), pp. 232–237. doi: 10.1080/00480169.2003.36372.
- Aparicio, E. D. (2013) 'Epidemiología de la brucelosis causada por *Brucella melitensis*, *Brucella suis* y *Brucella abortus* en animales domésticos', *Revue scientifique et technique*, 32(1), pp. 43–51.
- Armengol, R., Pabón, M., Santolaria, P., Cabezón, O., Adelantado, C., Yániz, J., López-Gatius, F. and Almería, S. (2007) 'Low seroprevalence of *Neospora caninum* infection associated with the limousin breed in cow-calf herds in Andorra, Europe', *Journal of Parasitology*, 93(5), pp. 1029–1032. doi: 10.1645/GE-1242R.1.
- Arricau, N. and Rodolakis, A. (2005) 'Is Q Fever an emerging or re-emerging zoonosis? Nathalie', *Veterinary Research*, 36, pp. 327–349. doi: 10.1051/vetres:2005010 327.
- Arroyo Carrera, I., López Rodríguez, M. J., Martínez Sapiña, A., López Lafuente, A. and Barrio Sacristán, A. R. (2006) 'Probable transmission of brucellosis by breast milk', *Journal of Tropical Pediatrics*, 52(5), pp. 380–381. doi: 10.1093/tropej/fml029.
- Aslantaş, Ö." and Özdemir, V. (2005) 'Determination of the seroprevalence of leptospirosis in cattle by MAT and ELISA in Hatay, Turkey', *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29(4), pp. 1019–1024.
- Asmare, K., Asfaw, Y., Gelaye, E. and Ayelet, G. (2010) 'Brucellosis in extensive management system of Zebu cattle in Sidama Zone, Southern Ethiopia', *African Journal of Agricultural Research*, 5(3), pp. 257–263. doi: 10.5897/AJAR09.045.
- Asmare, K., Regassa, F., Robertson, L. J. and Skjerve, E. (2013) 'Seroprevalence of *Neospora*

- caninum* and associated risk factors in intensive or semi-intensively managed dairy and breeding cattle of Ethiopia', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 193(1-3), pp. 85-94. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.025.
- Assenga, J. A., Matemba, L. E., Muller, S. K., Mhamphi, G. G. and Kazwala, R. R. (2015) 'Predominant *Leptospiral* Serogroups Circulating among Humans, Livestock and Wildlife in Katavi-Rukwa Ecosystem, Tanzania', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), pp. 1-14. doi: 10.1371/journal.pntd.0003607.
- Astobiza, I., Barandika, J. F., Ruiz-Fons, F., Hurtado, A., Povedano, I., Juste, R. A. and García-Pérez, A. L. (2011) '*Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination', *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 91(3). doi: 10.1016/j.rvsc.2010.11.014.
- Aznar, M. N., Samartino, L. E., Humblet, M. F. and Saegerman, C. (2014) 'Bovine Brucellosis in Argentina and Bordering Countries: Update', *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(2), pp. 121-133. doi: 10.1111/tbed.12018.
- Baek, B. K., Lim, C. W., Rahman, M. S., Kim, C.-H., Oluoch, A. and Kakoma, I. (2003) '*Brucella abortus* infection in indigenous Korean dogs', *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 67(4), pp. 312-314.
- Banazis, M. J., Bestall, A. S., Reid, S. A. and Fenwick, S. G. (2010) 'A survey of Western Australian sheep, cattle and kangaroos to determine the prevalence of *Coxiella burnetii*', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 143(2-4), pp. 337-345. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.002.
- Bañales, P., Fernandez, L., Repiso, M. V., Gil, A., Dargatz, D. A. and Osawa, T. (2006) 'A nationwide survey on seroprevalence of *Neospora caninum* infection in beef cattle in Uruguay', *Veterinary Parasitology*, 139(1-3), pp. 15-20. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.004.
- Baquero, M. I., López, N., Mejía, M. E. and Trueba, G. (2010) 'Evaluation of a Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Leptospirosis in Cattle', *The Open Veterinary Science Journal*, 4(1), pp. 31-35.
- Barajas Rojas, A. J. (1998) 'Aplicación de la técnica inmunoenzimática de ELISA para estudios epidemiológicos de enfermedades de ganado bovino en el trópico de México', *Ciencia Veterinaria*, 8, pp. 85-151.
- Barber, J. S., Gasser, R. B., Ellis, J., Reichel, M. P., McMillan, D. and Trees, A. J. (1997) 'Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in different canid populations.', *The Journal of parasitology*, 83(6), pp. 1056-8. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9406778>.

- Barling, K. S., McNeill, J. W., Paschal, J. C., McCollum, F. T., Craig, T. M., Adams, L. G. and Thompson, J. A. (2001) 'Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA', *Preventive Veterinary Medicine*, 52(1), pp. 53–61. doi: 10.1016/S0167-5877(01)00233-1.
- Barr, B. C., Conrad, P. A., Dubey, J. P. and Anderson, M. L. (1991) 'Neospora-like encephalomyelitis in a calf : pathology, ultrastructure, and immunoreactivity', 46, pp. 39–46.
- Barry, J. (1960) *Notable contributions to medical research by Public Health Service Scientists*. Edited by A. W. P. H. S. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION. Washington, D. C.: Public Health Service Publication No. 752.
- Bartels, C. J. M., Arnaiz-Seco, J. I., Ruiz-Santa-Quitera, A., Björkman, C., Frössling, J., Von Blumröder, D., Conraths, F. J., Schares, G., Van Maanen, C., Wouda, W. and Ortega-Mora, L. M. (2006) 'Supranational comparison of *Neospora caninum* seroprevalences in cattle in Germany, The Netherlands, Spain and Sweden', *Veterinary Parasitology*, 137(1–2), pp. 17–27. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.12.016.
- Basso, W., Schares, S., Minke, L., Bärwald, A., Maksimov, A., Peters, M., Schulze, C., Müller, M., Conraths, F. J. and Schares, G. (2010) 'Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion', *Veterinary Parasitology*, 173(1–2), pp. 24–31. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.06.009.
- Baszler, T. V., Adams, S., Vander-schalie, J., Mathison, B. a and 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', *Society*, 39(11), pp. 3851–3857. doi: 10.1128/JCM.39.11.3851.
- Beard, B. C. (2008) 'Parasites and Infectious Diseases: Discovery by Serendipity and Otherwise', *Emerging Infectious Diseases*, 14(3), p. 532b–533. doi: 10.3201/eid1403.071540.
- Beck, R., Marinculić, A., Mihaljević, Z., Benić, M. and Martinković, F. (2010) 'Seroprevalence and potential risk factors of *Neospora caninum* infection in dairy cattle in Croatia', *Veterinarski Arhiv*, 80(2).
- Beldomenico, P. M. and Begon, M. (2010) 'Disease spread, susceptibility and infection intensity: vicious circles?', *Trends in Ecology and Evolution*, 25(1), pp. 21–27. doi:

10.1016/j.tree.2009.06.015.

- Bermúdez, S., Pulido, M. and Andrade, R. (2010) 'Seroprevalencia de *Leptospira* spp en caninos y humanos de tres barrios de Tunja, Colombia', *Revista MVZ Córdoba*, 15(3). Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682010000300006.
- Bewley, K. R. (2013) 'Animal models of Q fever (*Coxiella burnetii*)', *Comparative Medicine*, 63(6), pp. 469–476.
- Bharti, A. R., Nally, J. E., Ricaldi, J. N., Matthias, M. A., Diaz, M. M., Lovett, M. A., Levett, P. N., Gilman, R. H., Willig, M. R., Gotuzzo, E. and Vinetz, J. M. (2003) 'Reviews Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance', *The Lancet*, 3(December), pp. 757–771. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00830-2.
- Bjerkas, I., Mohn, S. F. and Presthus, J. (1984) 'Unidentified cyst-forming Sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs', *Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research*, 70(2), pp. 271–274. doi: 10.1007/BF00942230.
- Blair, P. J., Schoeler, G. B., Moron, C., Anaya, E., Caceda, R., Cespedes, M., Cruz, C., Felices, V., Guevara, C., Huaman, A., Luckett, R., Mendoza, L., Richards, A. L., Rios, Z., Sumner, J. W., Villaseca, P. and Olson, J. G. (2004) 'Evidence of Rickettsial and *Leptospira* infections in Andean northern Peru', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(4), pp. 357–363. doi: 70/4/357 [pii].
- Boarbi, S., Fretin, D. and Mori, M. (2016) '*Coxiella burnetii*, agent de la fièvre Q', *NRC Research Press*, 122, pp. 102–122. doi: 10.1139/cjm-2015-0551.
- Bolin, C. (2000) 'Leptospirosis, p 185-200. In Brown C, Bolin C. ', in *Emerging Diseases of Animals. ASM Press, Washington, DC*. doi: 10.1128/9781555818050.ch9. American Society of Microbiology, pp. 185–200. doi: 10.1128/9781555818050.ch9.
- Bolin, C. A. (2003) 'Diagnosis and Control of Bovine Leptospirosis', *Proceedings of the 6th Western Dairy Management Conference*, (517), pp. 155–160.
- Borba, M. R., Stevenson, M. A., Gonçalves, V. S. P., Neto, J. S. F., Ferreira, F., Amaku, M., Telles, E. O., Santana, S. S., Ferreira, J. C. A., Lobo, J. R., Figueiredo, V. C. F. and Dias, R. A. (2013) 'Prevalence and risk-mapping of bovine brucellosis in Maranhao State, Brazil', *Preventive Veterinary Medicine*, 110(2), pp. 169–176. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.11.013.
- Böttcher, J., Vossen, A., Janowetz, B., Alex, M., Gangl, A., Randt, A. and Meier, N. (2011) 'Insights

- into the dynamics of endemic *Coxiella burnetii* infection in cattle by application of phase-specific ELISAs in an infected dairy herd', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 151(3–4), pp. 291–300. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.03.007.
- Boukary, A. R., Saegerman, C., Abatih, E., Fretin, D., Alamb?dji Bada, R., De Deken, R., Harouna, H. A., Yenikoye, A. and Thys, E. (2013) 'Seroprevalence and Potential Risk Factors for *Brucella* spp. Infection in Traditional Cattle, Sheep and Goats Reared in Urban, Periurban and Rural Areas of Niger', *PLoS ONE*. Edited by Q. Zhang, 8(12), p. e83175. doi: 10.1371/journal.pone.0083175.
- Bregoli, M., Gioia, C., Stefano, N., Mariapia, C. and Claudio, P. (2006) 'Serological survey of *Neospora caninum* in free-ranging wild ruminants', *Veterinarski Arhiv*, 76(Suppl. S), pp. S111–S115.
- Briones, G., Inon de Iannino, N., Roset, M., Vigliocco, A., Paulo, P. S. and Ugalde, R. A. (2001) '*Brucella abortus* Cyclic ?-1,2-Glucan Mutants Have Reduced Virulence in Mice and Are Defective in Intracellular Replication in HeLa Cells', *Infection and Immunity*, 69(7), pp. 4528–4535. doi: 10.1128/IAI.69.7.4528-4535.2001.
- Brodersen, B. W. (2010) 'Bovine Respiratory Syncytial Virus', *The Veterinary clinics of North America. Food Animal Practice*. Elsevier Ltd, 26(2), pp. 323–333. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.04.010.
- Bruhn, F. R. P., Daher, D. O., Lopes, E., Barbieri, J. M., da Rocha, C. M. B. M. and Guimarães, A. M. (2013) 'Factors associated with seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy cattle in southeastern Brazil', *Tropical Animal Health and Production*, 45(5), pp. 1093–1098. doi: 10.1007/s11250-012-0330-y.
- Cabassi, C. S., Taddei, S., Donofrio, G., Ghidini, F., Piancastelli, C., Flammini, C. F. and Cavirani, S. (2006) 'Association between *Coxiella burnetii* seropositivity and abortion in dairy cattle of Northern Italy', *New Microbiologica*, 29(3), pp. 211–214.
- Caetano-da-Silva, A., Ferre, I., Collantes-Fernández, E., Navarro, V., Aduriz, G., Ugarte-Garagalza, C. and Ortega-Mora, L. M. (2004) 'Occasional detection of *Neospora caninum* DNA in frozen extended semen from naturally infected bulls', *Theriogenology*, 62(7), pp. 1329–1336. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.01.010.
- Campero, C. M., Anderson, M. L., Conosciuto, G., Odriozola, H., Bretschneider, G. and Poso, M. A. (1998) '*Neospora caninum*-associated abortion in a dairy herd in Argentina', *The Veterinary Record*, 143(8), pp. 228–229. doi: dx.doi.org/10.1136/vr.143.8.228.
- Campero, C. M., Moore, D. P., Lagomarsino, H., Odeón, A. C., Castro, M. and Visca, H. (2003) 'Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo

- transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows.' *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 50(9), pp. 458–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14633201>.
- Canada, N., Meireles, C. S., Mezo, M., González-Warleta, M., Correia da Costa, J. M., Sreekumar, C., Hill, D. E., Miska, K. B. and Dubey, J. P. (2004) 'First Isolation of *Neospora caninum* From an Aborted Bovine Fetus in Spain', *Journal of Parasitology*, 90(4), pp. 863–864. doi: 10.1645/GE-306.
- Carbonero, A., Guzmán, L. T., Montaña, K., Torralbo, A., Arenas-Montes, A. and Saa, L. R. (2015) '*Coxiella burnetii* seroprevalence and associated risk factors in dairy and mixed cattle farms from Ecuador', *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), pp. 427–435. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.01.007.
- Carbonero, A., Saa, L. ., Jara, D. ., García-Bocanegra, I., Arenas, A., Borge, C., & Perea, A. (2011). Seroprevalence and risk factors associated to Bovine Herpesvirus 1 (BHV-1) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Preventive Veterinary Medicine*, 100(1), 84–88. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.03.006>
- Carvalho, N. A. V, Mol, J. P. S., Xavier, M. N., Paixão, T. A., Lage, A. P. and Santos, R. L. (2010) 'Pathogenesis of bovine brucellosis', *Veterinary Journal*. Elsevier Ltd, 184(2), pp. 146–155. doi: 10.1016/j.tvjl.2009.04.010.
- Castro, HA.; González, S. and Prat, M. (2005) 'Brucellosis: una revisión práctica', *Acta Bioquim Clin Latinoam*, 39(2), pp. 203–216.
- Céspedes Z, M. (2005) 'Artículo De Revisión Leptospirosis : Enfermedad Zoonótica Reemergente', *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 22(4), pp. 290–307. doi: 10.17843/RPMESP.2005.224.1009.
- Chadsuthi, S., Bicout, D. J., Wiratsudakul, A., Suwancharoen, D., Petkanchanapong, W., Modchang, C., Triampo, W., Ratanakorn, P. and Chalvet-Monfray, K. (2017) 'Investigation on predominant *Leptospira* serovars and its distribution in humans and livestock in Thailand, 2010-2015', *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by N. P. Day, 11(2), p. e0005228. doi: 10.1371/journal.pntd.0005228.
- Chand, P. and Chhabra, R. (2013) 'Herd and individual animal prevalence of bovine brucellosis with associated risk factors on dairy farms in Haryana and Punjab in India', *Tropical Animal Health and Production*, 45(6), pp. 1313–1319. doi: 10.1007/s11250-013-0362-y.
- Chiebao, D. P., Valadas, S. Y. O. B., Minervino, A. H. H., Castro, V., Romaldini, A. H. C. N., Calhau, A. S., De Souza, R. A. B., Gennari, S. M., Keid, L. B. and Soares, R. M. (2015) 'Variables

- Associated with Infections of Cattle by *Brucella abortus*, *Leptospira* spp. and *Neospora* spp. in Amazon Region in Brazil', *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(5), pp. e30–e36. doi: 10.1111/tbed.12201.
- Choromanski, L. and Block, W. (2000) 'Humoral immune responses and safety of experimental formulations of inactivated *Neospora* vaccines.' *Parasitology research*, 86(10), pp. 851–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11068819>.
- Colwell, R. R. (2000) 'Alice C. Evans : Breaking Barriers', *Yale Journal of Biology and Medicine*, 72(1999), pp. 349–356.
- Contreras, V., González, M., Guzmán, C. and Máttar, S. (2013) 'Fiebre Q: una zoonosis olvidada en Colombia Q fever: a neglected zoonosis in Colombia', *Rev. med. Risaralda*, 19(16), pp. 137–146. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-06672013000200007.
- Corbel, M. (1997) 'Brucellosis: an Overview', *Emerging Infectious Diseases*, 3(2), pp. 213–221. doi: 10.3201/eid0302.970219.
- Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., Stein, C., Abela-Ridder, B. and Ko, A. I. (2015) 'Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), pp. 0–1. doi: 10.1371/journal.pntd.0003898.
- Costa, P. . G. da, Brigatte, M. and Greco, D. B. (2005) 'Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana*, and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil', *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 100(8), pp. 853–859. doi: doi.org/10.1590/S0074-02762005000800006.
- Cousins, D. V, Robertson, G. M. and Hustas, L. (1985) 'The use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect the IgM and IgG antibody response to *Leptospira interrogans* serovars Hardjo, Pomona and Tarassovi in cattle', *Veterinary microbiology*, 10, pp. 439–450.
- Cullen, P., Haake, D. and Adler, B. (2004) 'Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes', *FEMS Microbiology Reviews*, 28(3), pp. 291–318. doi: 10.1016/j.femsre.2003.10.004.Outer.
- Cutler, S. J., Bouzid, M. and Cutler, R. R. (2007) 'Q fever', *Journal of Infection*, 54(4), pp. 313–318. doi: 10.1016/j.jinf.2006.10.048.

- de Alencar Mota, A. L. A., Ferreira, F., Ferreira Neto, J. S., Dias, R. A., Amaku, M., Hildebrand Grisi-Filho, J. H., Telles, E. O. and Picao Goncalves, V. S. (2016) 'Large-scale study of herd-level risk factors for bovine brucellosis in Brazil', *Acta Tropica*, 164, pp. 226–232. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.09.016.
- De Marez, T., Liddell, S., Dubey, J. P., Jenkins, M. C. and Gasbarre, L. (1999) 'Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses.' *International journal for parasitology*, 29(10), pp. 1647–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608451>.
- Dean, A. S., Bonfoh, B., Kulo, A. E., Boukaya, G. A., Amidou, M., Hattendorf, J., Pilo, P. and Schelling, E. (2013) 'Epidemiology of Brucellosis and Q Fever in Linked Human and Animal Populations in Northern Togo', *PLoS ONE*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0071501.
- Derrick, E. H. (1944) 'The Epidemiology of Q Fever', *The Journal of Hygiene*, 43(5), pp. 357–361.
- Dirar, B. G., Nasinyama, G. W. and Gelalcha, B. D. (2015) 'Seroprevalence and risk factors for brucellosis in cattle in selected districts of Jimma zone, Ethiopia', *Tropical Animal Health and Production*, 47, pp. 1615–1619. doi: 10.1007/s11250-015-0910-8.
- Dirección de Epidemiología, M. D. S. D. L. N. (2013) 'Enfermedades infecciosas | Brucelosis Guía para el equipo de salud', p. 55. Available at: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000304cnt-guia-medica-brucelosis.pdf>.
- Donahoe, S. L., Lindsay, S. A., Krockenberger, M., Phalen, D. and Šlapeta, J. (2015) 'A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife', *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. The Authors, 4(2), pp. 216–238. doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.04.002.
- Dorneles, E. M., Sriranganathan, N. and Lage, A. P. (2015) 'Recent advances in *Brucella abortus* vaccines.' *Veterinary research*. Veterinary Research, 46(1), p. 76. doi: 10.1186/s13567-015-0199-7.
- Dorneles, E., Teixeira-Carvalho, A., Araújo, M., Sriranganathan, N. and Lage, A. (2015) 'Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 33(31), pp. 3659–3666. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.057.
- dos Santos, J. P., Lima-Ribeiro, A. M. C., Oliveira, P. R., dos Santos, M. P., Júnior, Á. F., Medeiros, A. A. and Tavares, T. C. F. (2012) 'Seroprevalence and risk factors for Leptospirosis in

- goats in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil', *Tropical Animal Health and Production*, 44(1), pp. 101–106. doi: 10.1007/s11250-011-9894-1.
- Dubey, J. P. (2003) 'Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals.' *The Korean journal of parasitology*, 41(1), pp. 1–16. doi: 10.3347/kjp.2003.41.1.1.
- Dubey, J. P. (2005) 'Neosporosis in Cattle', *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 21(2), pp. 473–483. doi: 10.1016/j.cvfa.2005.03.004.
- Dubey, J. P. and Lindsay, D. S. (1993) 'Neosporosis', *Parasitology Today*, 9(12), pp. 452–458.
- Dubey, J. P. and Schares, G. (2006) 'Diagnosis of bovine neosporosis', *Veterinary Parasitology*, 140(1–2), pp. 1–34. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.03.035.
- Dubey, J. P. and Schares, G. (2011) 'Neosporosis in animals-The last five years', *Veterinary Parasitology*, 180(1–2), pp. 90–108. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.031.
- Dubey, J. P., Barr, B. C., Barta, J. R., Bjerkaa, I., Björkman, C., Blagburn, B. L., Bowman, D. D., Buxton, D., Ellis, J. T., Gottstein, B., Hemphill, A., Hill, D. E., Howe, D. K., Jenkins, M. C., Kobayashi, Y., Koudela, B., Marsh, A. E., Mattsson, J. G., McAllister, M. M., Modrý, D., Omata, Y., Sibley, L. D., Speer, C. A., Trees, A. J., Uggla, A., Upton, S. J., Williams, D. J. L. and Lindsay, D. S. (2002a) 'Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia.', *International journal for parasitology*, 32(8), pp. 929–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076623>.
- Dubey, J. P., Buxton, D. and Wouda, W. (2006) 'Pathogenesis of Bovine Neosporosis', *Journal of Comparative Pathology*, 134(4), pp. 267–289. doi: 10.1016/j.jcpa.2005.11.004.
- Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J. and Uggla, A. (1988) 'Newly recognized fatal protozoan disease of dogs.' *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192(9), pp. 1269–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3391851>.
- Dubey, J. P., Hill, D. E., Lindsay, D. S., Jenkins, M. C., Uggla, A. and Speer, C. A. (2002b) '*Neospora caninum* and *Hammondia heydorni* are separate species/organisms.', *Trends in parasitology*, 18(2), pp. 66–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832296>.
- Dubey, J. P., Jenkins, M. C., Rajendran, C., Miska, K., Ferreira, L. R., Martins, J., Kwok, O. C. H. and Choudhary, S. (2011) 'Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 181(2–4), pp. 382–387. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.018.

- Dubey, J. P., Schares, G. and Ortega-Mora, L. M. (2007) 'Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*', *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), pp. 323–367. doi: 10.1128/CMR.00031-06.
- Dubey, J. P., Zarnke, R., Thomas, N. J., Wong, S. K., Van Bonn, W., Briggs, M., Davis, J. W., Ewing, R., Mense, M., Kwok, O. C. H., Romand, S. and Thulliez, P. (2003) '*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Sarcocystis canis*-like infections in marine mammals.', *Veterinary parasitology*, 116(4), pp. 275–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580799>.
- Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S. and Jourdain, E. (2015) 'The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated?', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 31(11), pp. 536–552. doi: 10.1016/j.pt.2015.06.014.
- EFSA, European Food Safety Authority, and ECDC, E. C. for D. P. and C., Boelaert, F., Stoicescu, A., Beloeil, P., Georgiadis, M., Mazzolini, E., Amore, G., Riolo, F., Abbinante, F., Lahuertamarin, A., Niskanen, T., Agency, V. L., Brunton, L. and Union, T. E. (2012) 'Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010', *EFSA Journal*, 10(3), pp. 1–442. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2597.
- Eleni, C., Crotti, S., Manuali, E., Costarelli, S., Filippini, G., Moscati, L. and Magnino, S. (2004) 'Detection of *Neospora caninum* in an aborted goat foetus', *Veterinary Parasitology*, 123(3–4), pp. 271–274. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.06.017.
- Ellis, W. A. (1983) 'Recent developments in bovine leptospirosis', *Vet. Annu.*, 23, pp. 91–95.
- Epelboin, L., Chesnais, C., Boulle, C., Drogoul, A.-S., Raoult, D., Djossou, F. and Mahamat, A. (2012) 'Q Fever Pneumonia in French Guiana: Prevalence, Risk Factors, and Prognostic Score', *Clinical Infectious Diseases*, 55(1), pp. 67–74. doi: 10.1093/cid/cis288.
- Estill, C. (2004) '*Neospora* associated abortion and field experience with a commercial vaccine in a dairy herd', in *Proceedings of the 23rd World Buiatrics Congress*. Quebec, Canada.
- Fang, F., Collins-Emerson, J. M., Cullum, A., Heuer, C., Wilson, P. R. and Benschop, J. (2015) 'Shedding and seroprevalence of pathogenic *Leptospira* spp. in sheep and cattle at a New Zealand Abattoir', *Zoonoses and Public Health*, 62(4), pp. 258–268. doi: 10.1111/zph.12146.
- FAO. (2012). Experiencias exitosas de integración asociativa de Productores Lecheros Familiares: Tres Estudios de Caso en Nicaragua, Ecuador y Paraguay. *Oficina Regional de La FAO Para América Latina Y El Caribe. División de Producción Y Sanidad Animal.*

- Santiago. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-as153s.pdf>
- FAO. (2013). Producción y productos lácteos. Retrieved June 12, 2017, from <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/produccion-lechera/es/#.WT9oSes1-M8>
- FAO. (2017). Ganadería primaria. Retrieved June 13, 2017, from <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL>
- Fávero, J. F., de Araújo, H. L., Lilenbaum, W., Machado, G., Tonin, A. A., Baldissera, M. D., Stefani, L. M. and Da Silva, A. S. (2017) 'Bovine leptospirosis: Prevalence, associated risk factors for infection and their cause-effect relation', *Microbial Pathogenesis*, 107, pp. 149–154. doi: 10.1016/j.micpath.2017.03.032.
- Fenollar, F. and Raoult, D. (2007) 'Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(SUPPL. 1), pp. 7–15. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.06.024.
- Ficht, T. A. (2003) 'Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence.' *Veterinary microbiology*, 92(3), pp. 213–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12523983>.
- Figueiredo, A. de O., Pellegrin, A. O., Gonsalves, V. S. P., Freitas, E. B., Monteiro, L. A. R. C., Oliveira, J. M. de and Osorio, A. L. A. R. (2009) 'Prevalencia e fatores de risco para a leptospirose em bovinos de Mato Grosso do Sul', *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 29(5), pp. 375–381. doi: 10.1590/S0100-736X2009000500003.
- Figueiredo, P. De, Ficht, T. A., Rice-ficht, A., Rossetti, C. A. and Adams, L. G. (2015) 'Pathogenesis and Immunobiology of Brucellosis Review of *Brucella* e Host Interactions', *The American Journal of Pathology*. Elsevier, 185(6), pp. 1505–1517. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.03.003.
- FIRA. (2017). Panorama Agroalimentario. Carne de bovino 2017. México: FIRA, Dirección de Investigación y Evaluación Económica y Sectorial.
- Flores Castro, R. (2010) 'La situación actual de las zoonosis más frecuentes en el mundo.', *Gaceta médica de México*, 146(6), pp. 423–429.
- Fort, M., Edelsten, M., Maley, S. and Innes, E. (2015) 'Seroepidemiological study of *Neospora caninum* in beef and dairy cattle in La Pampa, Argentina', *Acta Parasitol*, 60(2), pp. 275–282. doi: 10.1515/ap-2015-0039.

- Fournier, P. E., Marrie, T. J. and Raoult, D. (1998) 'Diagnosis of Q fever', *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), pp. 1823–1834. doi: 0095-1137/98/\$04.00?0.
- Franco, M. P., Mulder, M., Gilman, R. H. and Smits, H. L. (2007) 'Human brucellosis', *Lancet Infect. Dis.*, 7(1473–3099 (Print)), pp. 775–786. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70286-4.
- Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B. and Hemphill, A. (1998) 'Differential expression of cell surface- and dense granule-associated *Neospora caninum* proteins in tachyzoites and bradyzoites.', *The Journal of parasitology*, 84(4), pp. 753–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9714206>.
- Fugier, E., Pappas, G. and Gorvel, J.-P. (2007) 'Virulence factors in brucellosis: implications for aetiopathogenesis and treatment', *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 9(35), pp. 1–10. doi: 10.1017/S1462399407000543.
- Furtado, A., Rosadilla, D., Cattáneo, M., Bermúdez, J. and Puentes, R. (2011) 'Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em pequenas propriedades leiteiras do Uruguai', *Ciência Rural*, 41(2011), pp. 673–675. doi: 10.1590/S0103-84782011005000035.
- Gami, A. S., Antonios, V. S., Thompson, R. L., Chaliki, H. P. and Ammash, N. M. (2004) 'Q Fever Endocarditis in the United States', *Mayo Clinic Proceedings*, 79(2), pp. 253–257. doi: 10.4065/79.2.253.
- García-Bocanegra, I., Cabezón, O., Pabón, M., Gómez-Guillamón, F., Arenas, A., Alcaide, E., Salas-Vega, R., Dubey, J. P. and Almería, S. (2012) 'Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*)', *The Veterinary Journal*, 191(2), pp. 257–260. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.11.011.
- García-Ispierto, I., Almería, S. and López-Gatius, F. (2011) 'Coxiella burnetii Seropositivity Is Highly Stable Throughout Gestation in Lactating High-Producing Dairy Cows', *Reproduction in Domestic Animals*, 1072(46), pp. 1067–1072. doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01788.x.
- García-Ispierto, I., Tutusaus, J. and López-Gatius, F. (2014) 'Review Article Does *Coxiella burnetii* Affect Reproduction in Cattle ? A Clinical Update', *Reproduction in Domestic Animals*, 49, pp. 529–535. doi: 10.1111/rda.12333.
- Gasque, G. (2008) 'Enciclopedia Bovina. Enfermedades de los Bovinos. Leptospirosis', in. México: Universidad Nacional Autónoma de México, p. 168.
- Ghigo, E., Pretat, L., Capo, C., Raoult, D. and Mege, J. (2009) 'Intracellular Life of *Coxiella burnetii*

- in Macrophages An Update', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1166, pp. 55–66. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04515.x.
- Glynn.K.M, L. T. . (2008) 'Zoonosis Update', *Vet Med Today*, 233(6), pp. 725–730.
- Godfroid, J., Scholz, H. C., Barbier, T., Nicolas, C., Wattiau, P., Fretin, D., Whatmore, A. M., Cloeckart, A., Blasco, J. M., Moriyon, I., Saegerman, C., Muma, J. B., Al Dahouk, S., Neubauer, H. and Letesson, J. J. (2011) 'Brucellosis at the animal/ecosystem/human interface at the beginning of the 21st century', *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier B.V., 102(2), pp. 118–131. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.007.
- Golding, B., Scott, D. E., Scharf, O., Huang, L. Y., Zaitseva, M., Lapham, C., Eller, N. and Golding, H. (2001) 'Immunity and protection against *Brucella abortus*.', *Microbes and infection*, 3(1), pp. 43–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11226853>.
- Gondim, L. F. ., McAllister, M. M., Pitt, W. C. and Zemlicka, D. E. (2004) 'Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*', *International Journal for Parasitology*, 34(2), pp. 159–161. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.01.001.
- Gondim, L. F. P., McAllister, M. M., Anderson-Sprecher, R. C., Björkman, C., Lock, T. F., Firkins, L. D., Gao, L. and Fischer, W. R. (2004) 'Transplacental transmission and cows administered *Neospora caninum* oocysts', *Journal of Parasitology*, 90(6), pp. 1394–1400. doi: 10.1645/GE-359R.
- Gondim, L. F. P., Pinheiro, A. M., Santos, P. O. M., Jesus, E. E. V., Ribeiro, M. B., Fernandes, H. S., Almeida, M. A. O., Freire, S. M., Meyer, R. and McAllister, M. M. (2001) 'Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected dog, and production of encysted bradyzoites in gerbils', *Veterinary Parasitology*, 101(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00493-9.
- Gonzalez Gontafalla, F. and Rivera Pirela, S. (2015) 'Caracterización de la leptospirosis bovina en Venezuela. Revisión breve sobre la enfermedad', *Revista Electronica de Veterinaria*, 16(2), pp. 1–22.
- González, C. and Moreira, R. (2003) Epidemiologic study of an outbreak of Q fever in the Lo Aguirre livestock quarantine station, Agriculture and Livestock Service (Chile)., *International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics proceedings, ISVEE 10: Proceedings of the 10th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*. Viña del Mar, Chile: International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics. Available at: <http://www.sciquest.org.nz/node/63488>.
- González-Warleta, M., Castro-Hermida, J. A., Carro-Corral, C. and Mezo, M. (2011) 'Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle',

- Preventive Veterinary Medicine*, 101(1–2), pp. 58–64. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.019.
- Goodswen, S. J., Kennedy, P. J. and Ellis, J. T. (2013) 'A review of the infection, genetics, and evolution of *Neospora caninum*: From the past to the present', *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V., 13(1), pp. 133–150. doi: 10.1016/j.meegid.2012.08.012.
- Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A. and Seegers, H. (2006) 'Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: Implications for detection and control', *Veterinary Research*, 37(6), pp. 827–833. doi: 10.1051/vetres:2006038.
- Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A. and Beaudeau, F. (2008) 'Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine', *Vaccine*, 26(34), pp. 4320–4328. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.06.023.
- Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A. F., Joly, A. and Beaudeau, F. (2011) 'Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in domestic ruminants: A critical review', *Veterinary Microbiology*, 149(1–2), pp. 1–16. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.10.007.
- Hall, C. A., Reichel, M. P. and Ellis, J. T. (2005) '*Neospora* abortions in dairy cattle: diagnosis, mode of transmission and control', *Veterinary Parasitology*, 128(3–4), pp. 231–241. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.12.012.
- Hamdy, M. E. R. and Amin, A. S. (2002) 'Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR.' *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 163(3), pp. 299–305. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12090772>.
- Hamond, C., Martins, G., Lilenbaum, W., Pinna, M. and Medeiros, M. A. (2015) 'Infection by *Leptospira* spp. in cattle in a tropical region, Rio de Janeiro, Brazil', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(1), p. 210. doi: 10.4269/ajtmh.14-0519.
- Hansen, M. S., Rodolakis, A., Cochonneau, D., Agger, J. F., Christoffersen, A. B., Jensen, T. K. and Agerholm, J. S. (2011) '*Coxiella burnetii* associated placental lesions and infection level in parturient cows', *Veterinary Journal*. Elsevier Ltd, 190(2), pp. e135–e139. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.12.021.
- Haro, R. (2003). *Informe sobre recursos zoonóticos Ecuador. Fao-MAGAP*. Quito. Retrieved from <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/a1250f/annexes/CountryReports/Ecuador.pdf>
- Hecker, Y. P., Cantón, G., Regidor-Cerrillo, J., Chianini, F., Morrell, E., Lischinsky, L., Ortega-Mora, L. M., Innes, E. A., Odeón, A., Campero, C. M. and Moore, D. P. (2015) 'Cell mediated immune responses in the placenta following challenge of vaccinated pregnant

- heifers with *Neospora caninum*', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 214(3–4), pp. 247–254. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.10.015.
- Hernández-Rodríguez, P., Díaz, C. A., Dalmau, E. A. and Quintero, G. M. (2011) 'A comparison between polymerase chain reaction (PCR) and traditional techniques for the diagnosis of leptospirosis in bovines', *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier B.V., 84(1), pp. 1–7. doi: 10.1016/j.mimet.2010.10.021.
- Heuer, C., Nicholson, C., Muñoz Bielsa, J. and Weston, J. F. (2003) 'Efficacy of a vaccine against *Neospora caninum* related in New Zealand dairy herds', in *International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics proceedings, ISVEE 10: Proceedings of the 10th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics*. Viña del Mar, Chile: International Symposia on Veterinary Epidemiology and Economics, p. 331.
- Hoeden, V. der J. (1958) 'Epizootiology of Leptospirosis', *Adv. Vet. Sci*, 4, pp. 278–339.
- Hogema, B. M., Slot, E., Molier, M., Schneeberger, P. M., Hermans, M. H., Van Hannen, E. J., Van Der Hoek, W., Cuijpers, H. T. and Zaaijer, H. L. (2012) '*Coxiella burnetii* infection among blood donors during the 2009 Q-fever outbreak in the Netherlands', *Transfusion*, 52(1), pp. 144–150. doi: 10.1111/j.1537-2995.2011.03250.x.
- Horton, K. C., Wasfy, M., Samaha, H., Abdel-Rahman, B., Safwat, S., Abdel Fadeel, M., Mohareb, E. and Dueger, E. (2014) 'Serosurvey for Zoonotic Viral and Bacterial Pathogens Among Slaughtered Livestock in Egypt', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14(9), pp. 633–639. doi: 10.1089/vbz.2013.1525.
- Hughes, L. (1896) 'Undulant (Malta) Fever', *The Lancet*, pp. 1875–1876.
- ICA, I. C. A. (1999) *Informe sección de información y vigilancia, División de sanidad animal, Subgerencia de fomento y servicios*. Bogotá.
- Ido, Y., Hoki, R., Ito, H. and Wani, H. (1917) 'THE RAT AS A CARRIER OF SPIROCHÆTA ICTEROHÆMORRHAGIÆ, THE CAUSATIVE AGENT OF WEIL'S DISEASE (SPIROCHÆTOSIS ICTEROHÆMORRHAGICA)', *The Journal of Experimental Medicine*. The Rockefeller University Press, 26(3), pp. 341–353. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2125787/>.
- Inada, R., Ido, Y., Rokuro, K., Kaneko, R. and Ito, H. (1915) 'The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's Disease (Spirochaetosis icterohaemorrhagica)', *J Exp Med*, 23. doi: 10.1084/jem.23.3.377.

- INEC, I. N. de E. y C. (2016). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua. Retrieved June 12, 2017, from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- Innes, E. A., Andrianarivo, A. G., Björkman, C., Williams, D. J. L. and Conrad, P. A. (2002) 'Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination.', *Trends in parasitology*, 18(11), pp. 497–504. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473366>.
- Innes, E. A., Wright, S., Bartley, P., Maley, S., Macaldowie, C., Esteban-Redondo, I. and Buxton, D. (2005) 'The host-parasite relationship in bovine neosporosis', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 108(1–2 SPEC. ISS.), pp. 29–36. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.07.004.
- Jenkins, M. C., Fetterer, R., Schares, G., Björkman, C., Wapenaar, W., McAllister, M. and Dubey, J. P. (2005) 'HPLC purification of recombinant NcGRA6 antigen improves enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of bovine neosporosis', *Veterinary Parasitology*, 131(3–4), pp. 227–234. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.05.005.
- Khalili Mohammad, M., Sakhaee, E., Aflatoonian, M. R. and Shahabi-Nejad, N. (2011) 'Herd-prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in dairy cattle farms based on bulk tank milk analyses', *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. Hainan Medical College, 4(1), pp. 58–60. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60033-3.
- Kim, E.-K., Hwang, J.-H., Hwang, J.-H. and Lee, C.-S. (2017) 'Is human brucellosis endemics in Korea?', *Yonsei Medical Journal*, 58(1), pp. 259–260. doi: 10.3349/ymj.2017.58.1.259.
- King, J. S., Šlapeta, J., Jenkins, D. J., Al-Qassab, S. E., Ellis, J. T. and Windsor, P. A. (2010) 'Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*', *International Journal for Parasitology*, 40(8), pp. 945–950. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.01.008.
- Klauck, V., Machado, G., Pazinato, R., Radavelli, W. M., Santos, D. S., Berwaguer, J. C., Braunig, P., Vogel, F. F. and Da Silva, A. S. (2016) 'Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease', *Microbial Pathogenesis*. Elsevier Ltd, 92(2016), pp. 46–49. doi: 10.1016/j.micpath.2015.12.015.
- Knobel, D. L., Maina, A. N., Cutler, S. J., Ogola, E., Feikin, D. R., Junghae, M., Halliday, J. E. B., Richards, A. L., Breiman, R. F., Cleaveland, S. and Njenga, M. K. (2013) '*Coxiella burnetii* in Humans, Domestic Ruminants, and Ticks in Rural Western Kenya', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(3), pp. 513–518. doi: 10.4269/ajtmh.12-0169.
- Ko, J. and Splitter, G. A. (2003) 'Molecular Host-Pathogen Interaction in Brucellosis: Current

- Understanding and Future Approaches to Vaccine Development for Mice and Humans', *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), pp. 65–78. doi: 10.1128/CMR.16.1.65-78.2003.
- Koyama, T., Kobayashi, Y., Omata, Y., Yamada, M., Furuoka, H., Maeda, R., Matsui, T., Saito, A. and Mikami, T. (2001) 'Isolation of *Neospora caninum* From the Brain of a Pregnant Sheep', *Journal of Parasitology*, 87(6), pp. 1486–1488. doi: 10.1645/0022-3395(2001)087[1486:IONCFT]2.0.CO;2.
- Larson, R. L., Hardin, D. K. and Pierce, V. L. (2004) 'Economic considerations for diagnostic and control options for *Neospora caninum*-induced abortions in endemically infected herds of beef cattle.' *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(10), pp. 1597–604. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15154728>.
- Levett, P. N. (2001) 'Leptospirosis', *Clinical Microbiological Reviews*, 14(2), pp. 296–326. doi: 10.1128/CMR.14.2.296.
- Levett, P. N. (2004) 'Leptospirosis: A forgotten zoonosis?', *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 4(6), pp. 435–448. doi: 10.1016/j.cair.2004.08.001.
- Levett, P. N. (2015) '*Leptospira* and Leptospirosis. Systematics of Leptospiraceae', in Adler, B. (ed.) *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1st edn. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 11–20. doi: 10.1007/978-3-662-45059-8.
- Lilenbaum, W. and Martins, G. (2014) 'Leptospirosis in cattle: A challenging scenario for the understanding of the epidemiology', *Transboundary and Emerging Diseases*, 61(SUPPL1.), pp. 63–68. doi: 10.1111/tbed.12233.
- Lilenbaum, W. and Souza, G. N. (2003) 'Factors associated with bovine leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil.', *Research in veterinary science*, 75(3), pp. 249–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129675>.
- Lindsay, D. and Dubey, J. P. (1989) 'Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum*', *American journal of veterinary research*, 50(11), pp. 1981–1983.
- Lista-Alves, D., Palomares-Naveda, R., Garcia, F., Obando, C., Arrieta, D. and Hoet, A. E. (2006) 'Serological evidence of *Neospora caninum* in dual-purpose cattle herds in Venezuela', *Veterinary Parasitology*, 136(3–4), pp. 347–349. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.11.027.
- Locatelli-Dittrich, R., Richartz, R. R. T. B., Joineau, M. E. G., Pinckney, R. D., de Sousa, R. S., Leite, L. C. and Thomaz-Soccol, V. (2003) 'Isolation of *Neospora caninum* from a blind calf in Paraná, southern Brazil.', *The Veterinary record*, 153(12), pp. 366–7. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14533770>.

- López-Gatius, F., Almeria, S. and Garcia-Ispuerto, I. (2012) 'Serological screening for *Coxiella burnetii* infection and related reproductive performance in high producing dairy cows', *Research in Veterinary Science*, 93(1), pp. 67–73. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.07.017.
- Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J. L., Garbayo, J. M. and Almeria, S. (2005) 'The Use of Beef Bull Semen Reduced the Risk of Abortion in *Neospora*-seropositive Dairy Cows', *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 52(2), pp. 88–92. doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00818.x.
- López-Helguera, I., López-Gatius, F., Tutusaús, J. and Garcia-Ispuerto, I. (2013) 'Reproductive performance of high producing lactating cows in *Coxiella*-infected herds following vaccination with phase-I *Coxiella burnetii* vaccine during advanced pregnancy', *Vaccine*. Elsevier Ltd, 31(30), pp. 3046–3050. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.04.067.
- Lorbacher de Ruiz, H. (1977) 'Q Fever in Colombia, S. A. A Serological Survey of Human and Bovine Populations', *Zoonoses and public health*, 24(4), pp. 287–292. doi: 10.1111/j.1439-0450.1977.tb01000.x.
- Lucero, N. E., Ayala, S. M., Escobar, G. I. and Jacob, N. R. (2008) 'Brucella isolated in humans and animals in Latin America from 1968 to 2006.', *Epidemiology and infection*, 136(4), pp. 496–503. doi: 10.1017/S0950268807008795.
- Lyoo, K.-S., Kim, D., Jang, H. G., Lee, S.-J., Park, M. Y. and Hahn, T.-W. (2017) 'Prevalence of Antibodies Against *Coxiella burnetii* in Korean Native Cattle, Dairy Cattle, and Dogs in South Korea', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(3), pp. 213–216. doi: 10.1089/vbz.2016.1977.
- Mackerras, I. M. (1979) 'Edward Holbrook Derrick', *Records of Australian Academy of Science*, 4(1), pp. 82–102. doi: doi.org/10.1071/HR9790410082.
- MAGAP. (2015). *La Política Agropecuaria Ecuatoriana - Hacia el desarrollo territorial rural sostenible 2015-2025 I Parte*. Quito, Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca.
- Manock, S. R., Jacobsen, K. H., De Bravo, N. B., Russell, K. L., Negrete, M., Olson, J. G., Sanchez, J. L., Blair, P. J., Smalligan, R. D., Quist, B. K., Espín, J. F., Espinoza, W. R., MacCormick, F., Fleming, L. C. and Kochel, T. (2009) 'Etiology of acute undifferentiated febrile illness in the Amazon basin of Ecuador', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), pp. 146–151. doi: 10.4269/ajtmh.08-0311

- Marrie, T. (2007) '20 Epidemiology of Q Fever.', in *Rickettsial diseases*, p. 281.
- Marrie, T. J. (1990) 'fever A review', *The Canadian Veterinary Journal*, 31(August), pp. 555–563.
- Martin, L. B., Weil, Z. M. and Nelson, R. J. (2008) 'Seasonal changes in vertebrate immune activity: mediation by physiological trade-offs', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1490), pp. 321–339. doi: 10.1098/rstb.2007.2142.
- Martins, G. and Lilenbaum, W. (2013) 'The panorama of animal leptospirosis in Rio de Janeiro, Brazil, regarding the seroepidemiology of the infection in tropical regions', *BMC Veterinary Research*, 9(1), p. 237. doi: 10.1186/1746-6148-9-237.
- Martins, G. and Lilenbaum, W. (2017) 'Control of bovine leptospirosis: Aspects for consideration in a tropical environment', *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 112, pp. 156–160. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.03.021.
- Mattar, S. and Parra, M. (2006) 'Detection of antibodies to Anaplasma, Bartonella and Coxiella in rural inhabitants of the caribbean area of Colombia', *Revista MVZ Córdoba*, 11(2), pp. 781–789.
- Maurin, M. and Raoult, D. (1999) 'Q fever.' *Clinical Microbiological Reviews*, 12(4), pp. 518–553. doi: citeulike-article-id:8656513.
- Mazeri, S., Scolamacchia, F., Handel, I. G., Morgan, K. L., Tanya, V. N. and Bronsvoort, B. M. de C. (2012) 'Risk factor analysis for antibodies to *Brucella*, *Leptospira* and *C. burnetii* among cattle in the Adamawa Region of Cameroon: a cross-sectional study', *Tropical Animal Health and Production*, 45(1), pp. 617–623. doi: 10.1007/s11250-012-0268-0.
- Mazeri, S., Scolamacchia, F., Handel, I. G., Morgan, K. L., Tanya, V. N. and Bronsvoort, B. M. de C. (2012) 'Risk factor analysis for antibodies to *Brucella*, *Leptospira* and *C. burnetii* among cattle in the Adamawa Region of Cameroon: a cross-sectional study', *Tropical Animal Health and Production*, 45(1), pp. 617–623. doi: 10.1007/s11250-012-0268-0.
- McAllister, M. M., Björkman, C., Anderson-Sprecher, R. and Rogers, D. G. (2000) 'Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows.' *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(6), pp. 881–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10997162>.
- McAllister, M. M., Dubey, J. ., Lindsay, D. S., Jolley, W. R., Wills, R. A. and McGuire, A. M. (1998) 'Rapid communication', *International Journal for Parasitology*, 28(9), pp. 1473–1479. doi: 10.1016/S0020-7519(98)00138-6.

- McBride, A., Athanazio, D. A., Reis, M. and Ko, A. I. (2005) 'Leptospirosis', *Current Opinion Infectious Disease*, 18, pp. 376–386.
- McCaughey, C., Murray, L. J., McKenna, J. P., Menzies, F. D., McCullough, S. J., O'Neill, H. J., Wyatt, D. E., Cardwell, C. R. and Coyle, P. V. (2010) 'Coxiella burnetii (Q fever) seroprevalence in cattle.', *Epidemiology and infection*, 138(1), pp. 21–27. doi: 10.1017/S0950268809002854.
- Medellín, M. O., Anaya, A. M. and Becerra, R. J. A. (2017) 'Asociación entre variables reproductivas y anticuerpos anti *Neospora caninum* en bovinos lecheros de un municipio de Colombia', *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, 8, pp. 167–174. doi: 10.22319/rmcp.v8i2.4439.
- Melo, D. P. G., Silva, A. C. DA, Ortega-Mora, L. M., Bastos, S. A. and Boaventura, C. M. (2006) 'Prevalência de Anticorpos Anti-*Neospora caninum* em Bovinos das Microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás, Brasil', *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 15, pp. 105–109. Available at: http://cbpv.org.br/rbpv/documentos/1532006/c153105_109.pdf.
- Messier, V., Lévesque, B., Proulx, J.-F., Rochette, L., Serhir, B., Couillard, M., Ward, B. J., Libman, M. D., Dewailly, É. and Déry, S. (2012) 'Seroprevalence of Seven Zoonotic Infections in Nunavik, Quebec (Canada)', *Zoonoses and Public Health*, 59(2), pp. 107–117. doi: 10.1111/j.1863-2378.2011.01424.x.
- Miller, D. A., Wilson, M. A. and Beran, G. W. (1991) 'Survey to estimate prevalence of *Leptospira interrogans* infection in mature cattle in the United States.', *American journal of veterinary research*, 52(11), pp. 1761–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1785719>.
- Mineiro, A. L. B. B., Bezerra, E. E. A., Vasconcellos, S. A., Costa, F. A. L. and Macedo, N. A. (2007) 'Infecção por *Leptospira* em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas', *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59(5), pp. 1103–1109. doi: 10.1590/S0102-09352007000500003.
- Moore, D. P. (2005) 'Neosporosis in South America', *Veterinary Parasitology*, 127(2), pp. 87–97. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.10.001.
- Moore, D. P., Campero, C. M., Odeón, A. C., Posso, M. A., Cano, D., Leunda, M. R., Basso, W., Venturini, M. C. and Späth, E. (2002) 'Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina.', *Veterinary parasitology*, 107(4), pp. 303–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163242>.

- Moore, D. P., Draghi, M. G., Campero, C. M., Cetrá, B., Odeón, A. C., Alcaraz, E. and Späth, E. A. J. (2003) 'Serological evidence of *Neospora caninum* infections in beef bulls in six counties of the Corrientes province, Argentina.', *Veterinary parasitology*, 114(4), pp. 247–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809751>.
- Moore, D. P., Odeón, A. C., Venturini, M. C. and Campero, C. M. (2005) 'Neosporosis bovina: Conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación', *Revista Argentina de Microbiología*, 37(4), pp. 217–228.
- Moore, D. P., Pérez, A., Agliano, S., Brace, M., Cantón, G., Cano, D., Leunda, M. R., Odeón, A. C., Odriozola, E. and Campero, C. M. (2009) 'Risk factors associated with *Neospora caninum* infections in cattle in Argentina', *Veterinary Parasitology*, 161(1–2), pp. 122–125. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.01.003.
- Moreno, E. (2002) 'Brucellosis in Central America', *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), pp. 31–38. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00242-0.
- Morrisette, N. S. and Sibley, L. D. (2002) 'Cytoskeleton of apicomplexan parasites.' *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 66(1), p. 21–38; table of contents. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11875126>.
- Mota, C. M., Oliveira, A. C. M., Davoli-Ferreira, M., Silva, M. V., Santiago, F. M., Nadipuram, S. M., Vashisht, A. A., Wohlschlegel, J. A., Bradley, P. J., Silva, J. S., Mineo, J. R. and Mineo, T. W. P. (2016) '*Neospora caninum* activates p38 MAPK as an evasion mechanism against innate immunity', *Frontiers in Microbiology*, 7(SEP), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.01456.
- Mughini-Gras, L., Bonfanti, L., Natale, A., Comin, A., Ferronato, A., La Greca, E., Patregnani, T., Lucchese, L. and Marangon, S. (2014) 'Application of an integrated outbreak management plan for the control of leptospirosis in dairy cattle herds', *Epidemiology and Infection*, 142(6), pp. 1172–1181. doi: 10.1017/S0950268813001817.
- Mugizi, D. R., Boqvist, S., Nasinyama, G. W., Waiswa, C., Ikwap, K., Rock, K., Lindahl, E., Magnusson, U. and Erume, J. (2015) 'Prevalence of and factors associated with *Brucella* seropositivity in cattle in urban and periurban Gulu and Soroti towns of Uganda', *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(5), pp. 557–564. doi: 10.1292/jvms.14-0452.
- Murray, G. L. (2013) 'The lipoprotein LipL32, An enigma of Leptospiral biology', *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 162(2–4), pp. 305–314. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.005.
- Musso, D. and La Scola, B. (2013) 'Laboratory diagnosis of leptospirosis: A challenge', *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. Elsevier, 46(4), pp. 245–252. doi:

10.1016/j.jmii.2013.03.001.

- Nagalingam, M., Thirumalesh, S. R. A., Kalleshmurthy, T., Niharika, N., Balamurugan, V., Shome, R., Sengupta, P. P., Shome, B. R., Prabhudas, K. and Rahman, H. (2015) 'Comparative evaluation of recombinant LigB protein and heat-killed antigen-based latex agglutination test with microscopic agglutination test for diagnosis of bovine leptospirosis', *Tropical Animal Health and Production*, 47(7), pp. 1329–1335. doi: 10.1007/s11250-015-0867-7.
- Natale, A., Busani, L., Comin, A., De Rui, S., Buffon, L., Nardelli, S., Marangon, S. and Ceglie, L. (2009) 'First report of bovine Q-fever in north-eastern Italy: Preliminary results', *Clinical Microbiology and Infection*, 15(SUPPL. 2), pp. 144–145. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02154.x.
- Natarajaseenivasan, K., Vedhagiri, K., Sivabalan, V., Prabakaran, S. G., Sukumar, S., Artiushin, S. C. and Timoney, J. F. (2011) 'Seroprevalence of *Leptospira borgpetersenii* serovar javanica infection among dairy cattle, rats and humans in the Cauvery river valley of southern India.', *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 42(3), pp. 679–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21706947>.
- Norlander, L. (2000) 'Q fever epidemiology and pathogenesis', *Microbes and Infection*, 2(4), pp. 417–424. doi: 10.1016/S1286-4579(00)00325-7.
- Ochoa, J. E., Sánchez, A. and Ruiz, I. (2000) 'Epidemiology of leptospirosis in a livestock production area of the Andes', *Rev Panam Salud Publica*, 7(5), pp. 325–331. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893973>.
- OIE (2004) 'Fiebre Q', *Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004*, pp. 421–432. Available at: http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.2.10_Fiebre_Q.pdf.
- OIE (2008) 'Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.1.9. Leptospiriosis', in, pp. 1–15.
- OIE (2010) *Lista de la OIE de las enfermedades, infecciones e infestaciones de los animales terrestres presentes, Ecuador, 2010*. Available at: http://www.oie.int/wahis_2/wah/action7_es.php (Accessed: 11 June 2017).
- OIE (2015) 'Q. Fever', in *OIE Terrestrial Manual 2015*, pp. 1–14. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.16_Q_FEVER.pdf.
- Olsen, S. and Tatum, F. (2010) 'Bovine Brucellosis', *Veterinary Clinics of North America - Food*

- Animal Practice*. Elsevier Ltd, 26(1), pp. 15–27. doi: 10.1016/j.cvfa.2009.10.006.
- Oñate, A., Andrews, E., Beltran, A., Eller, G., Schurig, G. and Folch, H. (2000) 'Frequent Exposure of Mice to Crude *Brucella abortus* Proteins Down-regulates Immune Response', *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 47(9), pp. 677–682. doi: 10.1046/j.1439-0450.2000.00402.x.
- Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (2015) 'Enfermedades, infecciones e infestaciones de la Lista de la OIE en vigor en 2015', *OIE*, pp. 1–4. Available at: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2015/>.
- Oropeza, M., Dickson, L., Maldonado, J. and Kowalski, A. (2010) 'Seropositividad a *Coxiella burnetii* en cabras de la parroquia Trinidad Samuel del municipio Torres, estado Lara, Venezuela', *Zootecnia Tropical*, 28(4), pp. 557–560.
- Ortega-Mora, L. M., Fernández-García, A. and Gómez-Bautista, M. (2006) 'Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives', *Acta Parasitologica*, 51(1), pp. 1–14. doi: 10.2478/s11686-006-0001-0.
- Osawa, T., Wastling, J., Acosta, L., Ortellado, C., Ibarra, J. and Innes, E. A. (2002) 'Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Paraguay', *Veterinary Parasitology*, 110(1–2), pp. 17–23. doi: 10.1016/S0304-4017(02)00309-6.
- Otaka, D. Y., Martins, G., Hamond, C., Penna, B., Medeiros, M. A. and Lilenbaum, W. (2012) 'Serology and PCR for bovine leptospirosis: herd and individual approaches: Table 1', *Veterinary Record*, 170(13), p. 338.2-338. doi: 10.1136/vr.100490.
- Otranto, D., Llazari, A., Testini, G., Traversa, D., Di Regalbono, A. F., Badan, M. and Capelli, G. (2003) 'Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy', *Veterinary Parasitology*, 118(1–2), pp. 7–18. doi: 10.1016/j.vetpar.2003.10.008.
- Panadero, R., Paineira, A., López, C., Vázquez, L., Paz, A., Díaz, P., Dacal, V., Cienfuegos, S., Fernández, G., Lago, N., Díez-Baños, P. and Morrondo, P. (2010) 'Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain)', *Research in Veterinary Science*. Elsevier Ltd, 88(1), pp. 111–115. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.05.010.
- Parvez, M. A., Prodhan, M. A. M., Rahman, M. A. and Faruque, M. R. (2015) 'Seroprevalence and associated risk factors of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo in dairy cattle of Chittagong, Bangladesh', *Pakistan Veterinary Journal*, 35(3), pp. 350–354.

- Pasquali, P., Adone, R., Gasbarre, L. C., Pistoia, C. and Ciuchini, F. (2001) 'Mouse Cytokine Profiles Associated with *Brucella abortus* RB51 Vaccination or *B. abortus* 2308 Infection', *Infection and Immunity*, 69(10), pp. 6541–6544. doi: 10.1128/IAI.69.10.6541-6544.2001.
- Paul, S., Agger, J. F., Agerholm, J. S. and Markussen, B. (2014) 'Prevalence and risk factors of *Coxiella burnetii* seropositivity in Danish beef and dairy cattle at slaughter adjusted for test uncertainty', *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier B.V., 113(4), pp. 504–511. doi: 10.1016/j.prevetmed.2014.01.018.
- Paul, S., Agger, J. F., Markussen, B., Christoffersen, A. B. and Agerholm, J. S. (2012) 'Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows', *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier B.V., 107(1–2), pp. 57–64. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.05.015.
- Paul, S., Toft, N., Agerholm, J. S., Christoffersen, A. B. and Agger, J. F. (2013) 'Bayesian estimation of sensitivity and specificity of *Coxiella burnetii* antibody ELISA tests in bovine blood and milk', *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier B.V., 109(3–4), pp. 258–263. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.10.007.
- Pereira, M. H. C., Cooke, R. F., Alfieri, A. A. and Vasconcelos, J. L. M. (2013) 'Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of lactating dairy cows submitted to AI', *Animal Reproduction Science*, 137(3–4), pp. 156–162. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.12.011.
- Picardeau, M. (2013) 'Diagnosis and epidemiology of leptospirosis', *Medecine et Maladies Infectieuses*, 43(1), pp. 1–9. doi: 10.1016/j.medmal.2012.11.005.
- Piergili Fioretti, D., Pasquali, P., Diaferia, M., Mangili, V. and Rosignoli, L. (2003) '*Neospora caninum* Infection and Congenital Transmission: Serological and Parasitological Study of Cows up to the Fourth Gestation', *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 50(8), pp. 399–404. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00686.x.
- Pimenta, C. L. R. M., Castro, V., Clementino, I. J., Alves, C. J., Fernandes, L. G., Brasil, A. W. L., Santos, C. S. A. B. and Azevedo, S. S. (2014) 'Leptospirose bovina no estado da Paraíba: Prevalência e fatores de risco associados à ocorrência de propriedades positivas', *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(4), pp. 332–336. doi: 10.1590/S0100-736X2014000400006.
- Pinto, P. S., Loureiro, A. P., Penna, B. and Lilenbaum, W. (2015) 'Usage of *Leptospira* spp. local strains as antigens increases the sensitivity of the serodiagnosis of bovine leptospirosis', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 149, pp. 163–167. doi:

10.1016/j.actatropica.2015.05.008.

- Poester, F., Samartino, L. E. and Santos, R. L. (2013) 'Pathogenesis and pathobiology of brucellosis in livestock', *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 32(1), pp. 105–115. doi: 10.20506/rst.32.1.2193.
- Poester, F., Figueiredo, V. C. F., Lôbo, J. R., Gonçalves, V. S. P., Lage, A. P., Roxo, E., Mota, P. M. P. C., Müller, E. E. and Neto, J. S. F. (2009) 'Estudos de prevalência da brucelose bovina no âmbito do Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose: Introdução', *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 61, pp. 1–5.
- Poulsen, K. P., Hutchins, F. T., McNulty, C. M., Tremblay, M., Zabala, C., Barragan, V., ... Bethel, J. W. (2014). Brucellosis in dairy cattle and goats in northern Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(4), 712–715. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0362>
- Poulsen, K. P., Hutchins, F. T., McNulty, C. M., Tremblay, M., Zabala, C., Barragan, V., Lopez, L., Trueba, G. and Bethel, J. W. (2014) 'Brucellosis in dairy cattle and goats in northern Ecuador', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(4), pp. 712–715. doi: 10.4269/ajtmh.13-0362.
- Psaroulaki, A., Hadjichristodoulou, C., Loukaidis, F., Soteriades, E., Konstantinidis, A., Papastergiou, P., Ioannidou, M. C. and Tselentis, Y. (2006) 'Epidemiological study of Q fever in humans, ruminant animals, and ticks in Cyprus using a geographical information system', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 25(9), pp. 576–586. doi: 10.1007/s10096-006-0170-7.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C. and Hinchliff, K. W. (2000) *Veterinary medicine: a text book of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*. 9th editio. Philadelphia: Saunders.
- Ramirez, M. and Rivera, S. (1999) 'Serological prevalence of leptospirosis bovine to risk factors at the Alberto Adriani municipality, Merida State, Venezuela', *Revista Científica-Facultad De Ciencias Veterinarias*, 9(5), pp. 418–426. Available at: FONAIAP-Anzoategui, Apartado 212. El Tigre, Edo. Anzoategui, Venezuela.
- Raoult, D., Tissot-Dupont, H., Foucault, C., Gouvernet, J., Fournier, P. E., Bernit, E., Stein, A., Nesri, M., Harle, J. R. and Weiller, P. J. (2000) 'Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections.' *Medicine*, 79(2), pp. 109–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10771709>.
- Reichel, M. P., Alejandra Ayanegui-Alcérreca, M., Gondim, L. F. P. and Ellis, J. T. (2013) 'What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question',

- International Journal for Parasitology*. Australian Society for Parasitology Inc., 43(2), pp. 133–142. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.10.022.
- Rinaldi, L., Fusco, G., Musella, V., Veneziano, V., Guarino, A., Taddei, R. and Cringoli, G. (2005) 'Neospora caninum in pastured cattle: determination of climatic, environmental, farm management and individual animal risk factors using remote sensing and geographical information systems', *Veterinary Parasitology*, 128(3–4), pp. 219–230. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.12.011.
- Rivera G. Hermelinda; Benito Z. Alfredo; Ramos C. Olger; Manchego S. Alberto (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 (2)(2), pp. 120–126. doi: 10.15381/rivep.v15i2.1580.
- Rivera, D., Rueda, O., Calderon, C., Mariño, O. and Gall, D. (2003) 'Evaluación comparativa del método inmunoenzimático indirecto en leche para la detección de bovinos infectados con *Brucella abortus*, en hatos del departamento de Introducción Materiales y métodos Material biológico', 22(3), pp. 1065–1075.
- Rivera, S. A., Ramírez, M. C. and Lopetegui, I. P. (2002) 'Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile', *Veterinary Microbiology*, 90(1–4), pp. 45–53. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00244-4.
- Rivers, R., Andrews, E., Gonzalez-Smith, A., Donoso, G. and Onate, A. (2006) '*Brucella abortus*: immunity, vaccines and prevention strategies based on nucleic acids', *Archivos De Medicina Veterinaria*, 38, pp. 7–18. Available at: <http://www.scielo.cl/pdf/amv/v38n1/Art02.pdf>.
- Rodolakis, A. (2009) 'Q fever in dairy animals', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1166, pp. 90–93. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04511.x.
- Rodrigues, A. A. R., Gennari, S. M., Aguiar, D. ., Sreekumar, C., Hill, D. E., Miska, K. B., Vianna, M. C. B. and Dubey, J. P. (2004) 'Shedding of *Neospora caninum* oocysts by dogs fed tissues from naturally infected water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Brazil', *Veterinary Parasitology*, 124(3–4), pp. 139–150. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.07.007.
- Rodríguez Zapata, M. and Solera Santos, J. (2014) 'Brucellosis', *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(52), pp. 3045–3053. doi: 10.1016/S0304-5412(14)70738-3.
- Rodríguez, A. M., Maresca, S., Cano, D. B., Armendano, J. I., Combessies, G., Lopéz-Valiente, S., Odriozola, E. R., Späth, E. J. L., Odeón, A. C., Campero, C. M. and Moore, D. P. (2016) 'Frequency of *Neospora caninum* infections in beef cow-calf operations under extensive

- management', *Veterinary Parasitology*. Elsevier B.V., 219, pp. 40–43. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.02.002.
- Rodríguez, R. I., Contreras-Zamora, J., Benitez Ortiz, W., Guerrero-Viracocha, K., Salcanguaman, H., Minda, E. and Ron Garrido, L. (2015) 'Circulating Strains of *Brucella abortus* in Cattle in Santo Domingo De Los Tsáchilas Province - Ecuador.', *Frontiers in public health*, 3(March), p. 45. doi: 10.3389/fpubh.2015.00045.
- Romero Becerra, L. R. and Veloza, L. C. (2014) 'Leptospirosis bovina como causa de enfermedad reproductiva Bovine', *Sistema Produção Agroecol*, 5(2), pp. 97–125. Available at: http://sistemasagroecologicos.co/revista/images/revistas/2014_2/articulo_8.pdf.
- Romero, J. J., Breda, S. Van, Vargas, B., Dolz, G. and Frankena, K. (2005) 'Effect of neosporosis on productive and reproductive performance of dairy cattle in Costa Rica', *Theriogenology*, 64(9), pp. 1928–1939. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.03.023.
- Romero, J. J., Pérez, E. and Frankena, K. (2004) 'Effect of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite vaccine on the crude abortion rate of Costa Rican dairy cows under field conditions', *Veterinary Parasitology*, 123(3–4), pp. 149–159. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.06.016.
- Ron Roman, J. W. (2003) 'Validación de técnicas diagnósticas para la detección de brucelosis, y estudio epidemiológico en una región andina del ...', (September 2003). doi: 10.13140/2.1.3171.7440.
- Ruiz, H. L. (1977) 'Q fever in Colombia S.A. A serological survey of human and bovine populations', *Zoonoses and Public Health*, 24(4), pp. 287–292. doi: 10.1111/j.1439-0450.1977.tb01000.x.
- Ruiz-Fons, F., Astobiza, I., Barandika, J. F., Hurtado, A., Atxaerandio, R., Juste, R. A. and Garcia-Perez, A. L. (2010) 'Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems', *BMC Vet Res*, 6, p. 3. doi: 10.1186/1746-6148-6-3.
- Saa, L., Perea, A., García-Bocanegra, I., Arenas, A., Jara, D., Ramos, R., & Carbonero, A. (2012). Seroprevalence and risk factors associated with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in non-vaccinated dairy and dual purpose cattle herds in Ecuador. *Tropical Animal Health and Production*, 44(3), 645–649.
- Salgado, M., Otto, B., Moroni, M., Sandoval, E., Reinhardt, G., Boqvist, S., Encina, C. and Muñoz-Zanzi, C. (2015) 'Isolation of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo prajitno from a calf with clinical leptospirosis in Chile', *BMC Veterinary Research*, 11(1), p. 66. doi:

10.1186/s12917-015-0369-x.

- Salgado, M., Otto, B., Sandoval, E., Reinhardt, G. and Boqvist, S. (2014) 'A cross sectional observational study to estimate herd level risk factors for *Leptospira* spp. serovars in small holder dairy cattle farms in southern Chile', *BMC Veterinary Research*, 10(1), p. 126. doi: 10.1186/1746-6148-10-126.
- Sanderson, M. , Gay, J. and Baszler, T. (2000) '*Neospora caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States', *Veterinary Parasitology*, 90(1–2), pp. 15–24. doi: 10.1016/S0304-4017(00)00234-X.
- Schoonman, L. and Swai, E. S. (2010) 'Herd- and animal-level risk factors for bovine leptospirosis in Tanga region of Tanzania', *Tropical Animal Health and Production*, 42(7), pp. 1565–1572. doi: 10.1007/s11250-010-9607-1.
- Segura-Correa, V. M., Solis-Calderon, J. J. and Segura-Correa, J. C. (2003) 'Seroprevalence of and risk factors for Leptospiral antibodies among cattle in the state of Yucatan, Mexico', *Tropical Animal Health and Production*, 35(4), pp. 293–299. doi: 10.1023/A:1025185703587.
- Seleem, M. N., Boyle, S. M. and Sriranganathan, N. (2010) 'Brucellosis: A re-emerging zoonosis', *Veterinary Microbiology*, 140(3–4), pp. 392–398. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.06.021.
- Sigurdson, C. G., Cords, B. R. and Fredell, D. (2004) 'Practical Hygiene and Disinfection on Dairy Farms'.
- Staubli, D., Nunez, S., Sager, H., Schares, G. and Gottstein, B. (2006) '*Neospora caninum* immunoblotting improves serodiagnosis of bovine neosporosis', *Parasitology Research*, 99(6), pp. 648–658. doi: 10.1007/s00436-006-0207-y.
- Suárez, C. and Maldonado, J. (2012) 'Seropositividad a *Neospora caninum* en unidades de producción bovina', *Zootecnia Trop*, 30(1), pp. 35–41.
- Szyfres, Boris. Blood, Benjamin. Moya, V. (1957) 'Estado actual de la Brucelosis en la América Latina', *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana*, pp. 48–64. Available at: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/14902/v46n1p48.pdf?sequence=1>.
- Taurel, A.-F., Guatteo, R., Joly, A., Seegers, H. and Beaudeau, F. (2011) 'Seroprevalence of Q fever in naturally infected dairy cattle herds.' *Preventive veterinary medicine*, 101(1–2), pp. 51–7. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.05.005.

- Tesfaye, G., Tsegaye, W., Chanie, M. and Abinet, F. (2011) 'Seroprevalence and associated risk factors of bovine brucellosis in Addis Ababa dairy farms', *Tropical Animal Health and Production*, 43(5), pp. 1001–1005. doi: 10.1007/s11250-011-9798-0.
- Thompson, J. A., de Miranda Henriques, L. R., Goncalves, V. S., Leite, R. C., Bandeira, D. A., Herrmann, G. P., Moreira, E. C., Prado, P. E., Lobato, Z. I., Portela and de Brito, Cristiane Pinheiro Lage, A. P. (2006) 'Spatial hierarchical variances and age covariances for seroprevalence to *Leptospira interrogans* serovar Hardjo, BoHV-1 and BVDV for cattle in the State of Paraíba, Brazil', *Preventive Veterinary Medicine*, 76(3–4), pp. 290–301. doi: 10.1016/j.prevetmed.2006.05.010.
- Torgerson, P. R., Hagan, J. E., Costa, F., Calcagno, J., Kane, M., Martinez-Silveira, M. S., Goris, M. G. A., Stein, C., Ko, A. I. and Abela-Ridder, B. (2015) 'Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pntd.0004122.
- Toyokawa, T., Ohnishi, M. and Koizumi, N. (2011) 'Diagnosis of acute leptospirosis', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9(1), pp. 111–121. doi: 10.1586/eri.10.151.
- Trees, A. J. and Williams, D. J. L. (2005) 'Endogenous and exogenous transplacental infection in *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*', *Trends in Parasitology*, 21(12), pp. 558–561. doi: 10.1016/j.pt.2005.09.005.
- Tutusaus, J., García-Ispuerto, I. and López-Gatius, F. (2015) 'Coxiella burnetti antibody dynamics in heifers born to vaccinated versus non-vaccinated dams in a chronically infected dairy herd', *Acta Veterinaria Hungarica*, 63(3), pp. 337–346. doi: 10.1556/004.2015.031.
- Vaidya, V. M., Malik, S. V. S., Bhilegaonkar, K. N., Rathore, R. S., Kaur, S. and Barbuddhe, S. B. (2010) 'Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders', *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 33(4), pp. 307–321. doi: 10.1016/j.cimid.2008.10.006.
- van den Brom, R., Schimmer, B., Schneeberger, P. M., Swart, W. A., van der Hoek, W. and Vellema, P. (2013) 'Seroepidemiological Survey for *Coxiella burnetii* Antibodies and Associated Risk Factors in Dutch Livestock Veterinarians', *PLoS ONE*, 8(1), pp. 1–6. doi: 10.1371/journal.pone.0054021.
- van der Hoek, W., Dijkstra, F., Schimmer, B., Schneeberger, P. M., Vellema, P., Wijkmans, C., ter Schegget, R., Hackert, V. and van Duynhoven, Y. (2010) 'Q fever in the Netherlands: An update on the epidemiology and control measures', *Eurosurveillance*, 15(12), pp. 57–60. doi: 19520.

- Van Do Weyer, L. M., Hendrick, S., Rosengren, L. and Waldner, C. L. (2011) 'Leptospirosis in beef herds from western Canada: Serum antibody titers and vaccination practices', *Canadian Veterinary Journal*, 52(6), pp. 619–626.
- van Schaik, E. J. and Samuel, J. E. (2012) 'Phylogenetic Diversity, Virulence and Comparative Genomics', in Toman, R., Heinzen, R. A., Samuel, J. E., and Mege, J.-L. (eds) *Coxiella burnetii: Recent Advances and New Perspectives in Research of the Q Fever Bacterium*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 13–38. doi: 10.1007/978-94-007-4315-1_2.
- VanLeeuwen, J. A., Haddad, J. P., Dohoo, I. R., Keefe, G. P., Tiwari, A. and Scott, H. M. (2010) 'Risk factors associated with *Neospora caninum* seropositivity in randomly sampled Canadian dairy cows and herds', *Preventive Veterinary Medicine*, 93(2–3), pp. 129–138. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.11.013.
- Vasconcellos, S. A. O. Barbarini, Junior O Umehara, O., Morais, Z. M., Cortez, A., Pinheiro, R. S., Ferreira, F., Favero, A. C. M. and Ferreira, N. J. S. (1997) 'Leptospirose bovina. Níveis de ocorrência e sorotipos predominantes em rebanhos dos estados de Minas Gerais, Sao Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Período de Janeiro a Abril de 1996', *Arq. Inst. Biol.*, (64), pp. 7–15.
- Vega López, CA., Ariza Andraca, R., And Rodríguez Weber, F. (2008) 'Brucelosis. Una infección vigente', *Acta Médica Grupo Ángeles*, 6(4), pp. 158–165.
- Venturini, M. C., Venturini, L., Bacigalupe, D., Machuca, M., Echaide, I., Basso, W., Unzaga, J. M., Di Lorenzo, C., Guglielmone, A., Jenkins, M. C. and Dubey, J. P. (1999) '*Neospora caninum* infections in bovine foetuses and dairy cows with abortions in Argentina.', *International journal for parasitology*, 29(10), pp. 1705–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10608457>.
- Vianna, M. C. B., Sreekumar, C., Miska, K. B., Hill, D. E. and Dubey, J. P. (2005) 'Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)', *Veterinary Parasitology*, 129(3–4), pp. 253–257. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.02.031.
- Vinetz, J. M. (2004) 'Vinetz JM. Leptospirosis is everywhere; just have to know what to look for. But how?', *Swiss Med Wkly*, (134), pp. 331–333.
- Vivian, J. P., Beddoe, T., McAlister, A. D., Wilce, M. C. J., Zaker-Tabrizi, L., Troy, S., Byres, E., Hoke, D. E., Cullen, P. A., Lo, M., Murray, G. L., Adler, B. and Rossjohn, J. (2009) 'Crystal Structure of LipL32, the Most Abundant Surface Protein of Pathogenic *Leptospira* spp.', *Journal of Molecular Biology*, 387(5), pp. 1229–1238. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.038>.

- Vongxay, K., Conlan, J. V, Khounsy, S., Dorny, P., Fenwick, S., Thompson, R. C. A. and Blacksell, S. D. (2012) 'Seroprevalence of major bovine-associated zoonotic infectious diseases in the Lao People's Democratic Republic.', *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 12(10), pp. 861–6. doi: 10.1089/vbz.2011.0850.
- Waag, D. M. (2007) 'Q FEVER', in Government Printing Office (ed.) *Medical Aspects of Biological Warfare*. Department of the Army, pp. 199–214.
- Wapenaar, W., Barkema, H. W., VanLeeuwen, J. A., McClure, J. T., O'Handley, R. M., Kwok, O. C. H., Thulliez, P., Dubey, J. P. and Jenkins, M. C. (2007) 'Comparison of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in cattle', *Veterinary Parasitology*, 143(2), pp. 166–173. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.08.007.
- WHO (2003) 'Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control', *WHO Library*, 45(5), pp. 1–109. doi: 10.1590/S0036-46652003000500015.
- Williams, D. J. ., Guy, C. ., Smith, R. ., Guy, F., McGarry, J. ., McKay, J. and Trees, A. (2003) 'First demonstration of protective immunity against foetopathy in cattle with latent *Neospora caninum* infection', *International Journal for Parasitology*, 33(10), pp. 1059–1065. doi: 10.1016/S0020-7519(03)00143-7.
- Williams, D. J. L., Hartley, C. S., Björkman, C. and Trees, A. J. (2009) 'Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease', *Parasitology*, 136(14), p. 1895. doi: 10.1017/S0031182009990588.
- Williams, J. H., Espie, I., van Wilpe, E. and Matthee, A. (2002) 'Neosporosis in a white rhinoceros (*Ceratotherium simum*) calf.' *Journal of the South African Veterinary Association*, 73(1), pp. 38–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12088073>.
- Woldehiwet, Z. (2004) 'Q fever (coxiellosis): Epidemiology and pathogenesis', *Research in Veterinary Science*, 77(2), pp. 93–100. doi: 10.1016/j.rvsc.2003.09.001.
- Woldehiwet, Z. and Sharma, R. (1992) 'Evidence of Immunosuppression by Bovine Respiratory Syncytial Virus', *Scandinavian Journal of Immunology*, 36(11), pp. 75–80. doi: 10.1111/j.1365-3083.1992.tb01624.x.
- Woodford, M. H. (2009) 'Veterinary aspects of ecological monitoring: The natural history of emerging infectious diseases of humans, domestic animals and wildlife', *Tropical Animal Health and Production*, 41(7), pp. 1023–1033. doi: 10.1007/s11250-008-9269-

4.

- World Organization for Animal Health (2016) 'Brucellosis (infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*)', *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, pp. 1–44. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.04_BRUCELLO_SIS.pdf.
- Wouda, W., Visser, I. J., Borst, G. H., Vos, J. H., Zeeuwen, A. A. and Peperkamp, N. H. (2000) 'Developmental anomalies in aborted and stillborn calves in The Netherlands.', *The Veterinary record*, 147(21), p. 612. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11110484>.
- Wyatt, H. V (2013) 'Lessons from the history of brucellosis.' *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 32(1), pp. 17–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23837362>.
- Xue, F., Yan, J. and Picardeau, M. (2009) 'Evolution and pathogenesis of *Leptospira* spp.: lessons learned from the genomes', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS, 11(3), pp. 328–333. doi: 10.1016/j.micinf.2008.12.007.
- Yaakob, Y., Rodrigues, K. F. and John, D. V. (2015) 'Leptospirosis: Recent incidents and available diagnostics - a review', *Medical Journal of Malaysia*, 70(6), pp. 351–355.
- Yagupsky, P. and Baron, E. J. (2005) 'Laboratory exposures to *Brucellae* and implications for bioterrorism', *Emerging Infectious Diseases*, pp. 1180–1185. doi: 10.3201/eid1108.041197.
- Yamane, I., Kokuho, T., Shimura, K., Eto, M., Shibahara, T., Haritani, M., Ouchi, Y., Sverlow, K. and Conrad, P. (1997) 'In vitro isolation and characterization of a bovine *Neospora* species in Japan', *Research in Veterinary Science*, 63(1), pp. 77–80. doi: 10.1016/S0034-5288(97)90162-4.
- Zhang, G., Russell-Iodrigue, K. E., Andoh, M., Zhang, Y., Hendrix, L. R. and Samuel, J. E. (2007) 'Mechanisms of Vaccine-Induced Protective Immunity against *Coxiella burnetii* Infection in BALB / c Mice 1', *The Journal of Immunology*, (179), pp. 8372–8380. doi: 10.4049/jimmunol.179.12.8372.
- Zuerner, R. L., Alt, D. P., Palmer, M. V., Thacker, T. C. and Olsen, S. C. (2011) 'A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization', *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(4), pp. 684–691. doi: 10.1128/CVI.00288-10.

Zuluaga L, A. G. (2009) 'Factores de riesgo asociados a leptospirosis en hatos bovinos de Pereira, 2002-2005', *Investigaciones Andina*, 11(19), pp. 108-118.