



Biotempo (Lima)

latindex
catálogo



<https://revistas.urp.edu.pe/index.php/Biotempo>

ORIGINAL ARTICLE / ARTÍCULO ORIGINAL

COMPARISON OF INDIRECT IMMUNOFLOUORESCENCE AND ELISA FOR THE DIAGNOSIS OF *NEOSPORA CANINUM* DUBEY, CARPENTER, SPEER, TOPPER & UGGLA, 1988 IN ALPACAS

COMPARACIÓN DE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA Y ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE *NEOSPORA CANINUM* DUBEY, CARPENTER, SPEER, TOPPER & UGGLA, 1988 EN ALPACAS

Enrique Serrano-Martínez^{1,*}; Elizabeth Hinostroza Meza¹; Marco Quispe Huacho¹; Guillermo Leguía Puente² & César Burga Cisterna¹

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú.

² Escuela de Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.

* Corresponding autor: enrique.serrano@upch.pe

Enrique Serrano-Martínez: <https://orcid.org/0000-0002-4452-2666>

Elizabeth Hinostroza-Meza: <https://orcid.org/0000-0002-7758-2630>

Marco Quispe-Huacho: <https://orcid.org/0000-0002-1194-0685>

Guillermo Leguía-Puente: <https://orcid.org/0000-0002-8787-6595>

César Burga-Cisterna: <https://orcid.org/0000-0002-2373-845X>

ABSTRACT

This study aimed to compare the techniques of indirect Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) techniques for the diagnosis of *Neospora caninum* Dubey, Carpenter, Speer, Topper & Uggla, 1988 in alpacas from the highlands of Peru. Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and concordance of IFAT were evaluated using a commercial competitive ELISA kit (cELISA - VMRD) as a reference. 1540 sera samples were collected from alpacas naturally exposed to *N. caninum*. The results showed good sensitivity (92.95%), high specificity (99.75%), a positive predictive value of 92.90%, and a negative predictive value of 99.04%. The concordance between both diagnostic techniques (IFAT and ELISA) turned out to be almost perfect ($k = 0.98$). It is concluded that the IFAT test has a high efficiency for the diagnosis of *N. caninum* in alpacas.

Keywords: alpaca – concordance – IFAT – Neosporosis– sensitivity – specificity

RESUMEN

El objetivo del estudio fue comparar las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) para el diagnóstico de *Neospora caninum* Dubey, Carpenter, Speer, Topper & Uggla, 1988 en



alpacas de la sierra del Perú. Se evaluó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y concordancia de IFI usando de referencia un kit comercial de ELISA competitivo (cELISA - VMRD). Se obtuvieron 1540 muestras de sueros de alpacas expuestas naturalmente a *N. caninum*. Los resultados muestran una buena sensibilidad (92,95%), alta especificidad (99,75%), valor predictivo positivo de 92,90% y un valor predictivo negativo de 99,04%. La concordancia entre ambas técnicas diagnósticas (IFI y ELISA) resultó ser casi perfecta ($k=0,98$). Se concluye que la prueba de IFI tiene un alto desempeño para el diagnóstico de *N. caninum* en alpacas.

Palabras clave: alpaca – concordancia – IFI – Neosporosis – sensibilidad – especificidad

INTRODUCCIÓN

La neosporosis es una enfermedad generada por el protozoo *Neospora caninum* Dubey, Carpenter, Speer, Topper & Uggla, 1988 (Dubey *et al.*, 1988) que ocasiona importantes pérdidas económicas por problemas reproductivos (Chi *et al.*, 2002; Dubey *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2013). Afecta a una gran variedad de animales y es considerada la principal causa de abortos en el ganado (Dubey, 2003; Cabral *et al.*, 2009; Bishop *et al.*, 2010; Jara *et al.*, 2011; Varaschin *et al.*, 2012). Esta enfermedad también afecta a los camélidos sudamericanos como las alpacas causando abortos (Chávez-Velásquez *et al.*, 2004; Serrano-Martínez *et al.*, 2004), reduciendo su productividad y perjudicando a los criadores campesinos de bajos recursos que se benefician de su fibra y carne (Vargas-Terán, 2005; Serrano-Martínez *et al.*, 2007).

El diagnóstico de la neosporosis es indispensable para su prevención y control. En la actualidad se han desarrollado diversas técnicas diagnósticas como Inmnoblot, Western blot, ELISA, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y aglutinación directa (Soler *et al.*, 2022). Entre las pruebas más usadas se encuentra el ELISA, que permite un rápido y sencillo análisis de las muestras. IFI fue la primera técnica serológica aplicada en el diagnóstico de neosporosis (Atkinson *et al.*, 2000; Ortega-Mora *et al.*, 2006; Campero *et al.*, 2015, Campero *et al.*, 2018). Sin embargo, la eficiencia de estas técnicas fue evaluada en especies bovinas, ovinas y caprinas, no existiendo en la actualidad una prueba diagnóstica evaluada específica en camélidos sudamericanos.

El actual desarrollo de tecnologías específicas para camélidos sudamericanos permite el mejoramiento en el diagnóstico de *N. caninum* en estas especies (Serrano-Martínez *et al.*, 2007). La creación de anticuerpos contra IgG de llama (cadena pesada y ligera) hechos a base anticuerpos de cabra, permite una gran versatilidad de aplicación en diversas pruebas diagnósticas como ELISA,

Western Blot e inmunofluorescencia (Anaya *et al.*, 2008). El uso de los anticuerpos específicos anti-IgG de llama permite realizar una prueba de IFI más específica en comparación a otras pruebas diagnósticas con anticuerpos anti IgG para otras especies (Daley *et al.*, 2005).

Por esta razón, el estudio buscó comparar las técnicas serológicas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA para el diagnóstico de *N. caninum* en alpacas, evaluando su concordancia en el desempeño diagnóstico, con la finalidad de tener una herramienta alternativa para su diagnóstico y control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se colectaron 1540 muestras de sueros de alpacas de las comunidades campesinas y empresas ganaderas del Perú de la Sierra Central de Junín y Huancavelica principalmente en INIA (Instituto Nacional de Innovación Agraria) de Huancayo y Lachocc de la Universidad de Huancavelica; y Sierra Sur de Cusco y Puno principalmente IVITA (Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura). La Raya del Distrito de Marangani y Quinsachata en distrito de Nuñoa/Melgar, colectando 385 muestras de cada provincia. Las muestras fueron colectadas entre noviembre de 2016 y diciembre de 2017. Los animales estuvieron bajo un sistema de crianza semi-intensiva. Todas las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena yugular y procesadas en el Laboratorio de Parasitología Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FAVEZ) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) en Lima.

Detección de Anticuerpos

Por ELISA

Para determinar la presencia de anticuerpos frente a *N. caninum* se utilizó un kit comercial (*Neospora caninum*

Ab Test Kit cELISA, Veterinary Medical Research & Development-VMRD, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. Este producto tiene una alta sensibilidad (96,4%) y especificidad (96,8%) (Baszler *et al.*, 2001). Los valores de la densidad óptica se midieron usando un espectrofotómetro de 650 nm.

Por IFI

Se utilizó la técnica IFI para la detección de anticuerpos específicos de *N. caninum* en suero sanguíneo de alpacas, descrita inicialmente por Trees (Trees *et al.*, 1993) y optimizada en el Laboratorio de Parasitología Animal de FAVEZ-UPCH. Como antígeno se utilizaron taquizoítos (107/ml) de la cepa NcSp1 donados por el grupo "SALUVET" de la Universidad Complutense de Madrid y reproducidos mediante cultivo de células Vero. El antisuero policlonal usado fue anti-IgG de llama conjugado con isotiocianato de fluoresceína (VMRD) en una dilución de 1:100 (Chávez-Velásquez *et al.*, 2004). Se consideró como muestra positiva la observación de la fluorescencia total del taquizoíto y como muestra negativa la falta de fluorescencia o fluorescencia parcial (Paré *et al.*, 1995).

Análisis de Datos

Se estimó la sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de IFI usando como referencia la prueba diagnóstica de cELISA, considerando que no existe la prueba "gold standard" para el diagnóstico de *N. caninum* en camélidos sudamericanos. El análisis de concordancia se realizó mediante el coeficiente de Kappa de Cohen con un nivel de significancia de 0,05 (Cantor, 1996). El desempeño de la prueba (S, E, VPP, VPN) y la concordancia fueron evaluados usando el software STATA 15 (StataCorp; College Station, TX).

RESULTADOS

La prueba de IFI, usando como prueba *gold standard* a cELISA-VMRD registró un alto desempeño para el diagnóstico de anticuerpos contra *N. caninum*, mostrando una sensibilidad de 92,90%, especificidad de 98,75%, valor predictivo positivo de 90,91% y un valor predictivo negativo de 99,04% (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados del desempeño de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) usando como referencia cELISA-VMRD para el diagnóstico serológico de inmunoglobulina G contra *Neospora caninum* en alpacas.

Técnica	Sensibilidad (%) (95% IC)	Especificidad (%) (95% IC)	Valor predictivo positivo (%) (95% IC)	Valor predictivo negativo (%) (95% IC)
ELISA	-	-	-	-
IFI	92,9 (92,8-93,0)	98,8 (98,7-98,8)	90,9 (90,7-91,1)	99,0 (98,9-99,5)

Tabla 2. Resultados del diagnóstico serológico de inmunoglobulina G contra *Neospora caninum* en alpacas con las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y cELISA-VMRD.

cELISA	IFI		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	170	13	183
Negativo	17	1340	1357
Total	187	1353	1540

(Kappa=0,98).

Los métodos diagnósticos de IFI y cELISA tienen una concordancia casi perfecta para determinar la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en alpacas, obteniendo un alto índice de Kappa (0,98) (Tabla 2).

DISCUSIÓN

La prueba de IFI demostró muy buen desempeño diagnóstico similar a la de ELISA como prueba diagnóstica de *N. caninum*. A pesar de que una de sus principales limitaciones es la subjetividad y el consumo de tiempo en el análisis, esta prueba sigue siendo ampliamente utilizada

a nivel mundial y es considerada como prueba “*gold standard*” (Atkinson *et al.*, 2000, Soler *et al.*, 2022).

El punto de corte de las diluciones a usar en la prueba de IFI es un tema de constante debate. Diversos estudios muestran óptimos puntos de corte que varían entre 1:100 a 1:640 para bovinos adultos y 1:16 a 1:80 para serología fetal (Björkman & Uggla, 1999; Álvarez-García *et al.*, 2003). Sin embargo, diluciones menores a 1:100 realizados en alpacas y llamas detectan anticuerpos no específicos y a partir de 1:100 los anticuerpos detectados son específicos (Chávez-Velásquez *et al.*, 2004). Este punto de corte permite mejorar la eficiencia de IFI en el diagnóstico de anticuerpos contra *N. caninum* en alpacas evitando reacciones cruzadas con otros apicomplexos (Gondim *et al.*, 2017).

Los altos niveles de especificidad alcanzados en la prueba de IFI sugieren que esta prueba puede ser utilizada como prueba confirmatoria. Esta alta especificidad es reflejada en otros estudios donde encuentran una especificidad más elevada que la sensibilidad (Atkinson *et al.*, 2000). Esto se asocia al criterio diagnóstico de la prueba, donde la fluorescencia total del taquizoito se considera como positivo (Paré *et al.*, 1995), necesitando una muestra con altos títulos de anticuerpos para lograr su total fluorescencia (Campero *et al.*, 2018; Soler *et al.*, 2022).

El tiempo de seroconversión de anticuerpos contra *N. caninum* es un factor para tomar en cuenta en la presentación de falsos negativos. Los anticuerpos conjugados usados en las pruebas serológicas tienen una alta afinidad contra IgG anti-*Neospora caninum* (Baszler *et al.*, 2001; Tomassetti *et al.*, 2013). Por otro lado, en bovinos se conoce que la seroconversión es rápida, logrando producir anticuerpos específicos a los nueve días de la infección y alcanzando los títulos más altos a los 32 días (Conrad *et al.*, 1993). Estos hallazgos sugieren que la rápida seroconversión en bovinos se puede repetir en los camélidos sudamericanos, reduciendo el número de falsos negativos; sin embargo, se necesitan estudios para evaluar esta semejanza.

A pesar de que el kit comercial de cELISA-VMDR usa anticuerpos contra IgG bovino, logró obtener un alto nivel de concordancia con la prueba de IFI que usa anticuerpos anti-IgG de llama. Este alto nivel de concordancia no solo se ve reflejado en alpacas, sino también en vicuñas, donde se encuentra un valor Kappa de 0,85 (Pinedo *et al.*, 2014). Esta versatilidad de las pruebas diagnósticas entre bovinos y camélidos sudamericanos se puede asociar a su alta relación genética (Alawad *et al.*, 2016), además que ambos pertenecen a la orden de los Artiodactyla (Pachaly, 2001, Alawad *et al.*, 2016).

Se concluye que la prueba diagnóstica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar anticuerpos contra *N. caninum* muestra una alta eficiencia, y que la concordancia diagnóstica es casi perfecta entre las técnicas serológicas IFI y cELISA para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* en alpacas ($k = 0,98$).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del estudio a Científica del CONCYTEC por el apoyo financiero brindado al proyecto “Obtención y caracterización del primer aislado de *Neospora caninum* causante de abortos en camélidos sudamericanos del Perú, con fines inmunodiagnóstico y vacunal” (Contrato 220-2015 FONDECYT-De), que permitió los análisis y la capacitación técnica de los investigadores para la ejecución del estudio. Del mismo modo, se agradece a los ganaderos (empresas ganaderas y comunidades campesinas) y tesisistas que colaboraron durante la recolección de las muestras. A Luis Miguel Ortega-Mora y al Grupo SALUVET de la Universidad Complutense de Madrid, España, por la donación de la cepa de *Neospora caninum* (NcSp1).

Author contributions: CRediT (Contributor Roles Taxonomy)

ESM = Enrique Serrano-Martínez

EHM = Elizabeth Hinostroza Meza¹

MQH = Marco Quispe Huacho

GLP = Guillermo Leguía Puente

CBC = César Burga Cisterna

Conceptualization: ESM

Data curation: ESM

Formal Analysis: CBC

Funding acquisition: ESM, GLP

Investigation: ESM

Methodology: ESM, MQH

Project administration: ESM

Resources: ESM

Software: ESM

Supervision: ESM, EHM

Validation: ESM, EHM

Visualization: ESM

Writing – original draft: ESM

Writing – review & editing: ESM

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alawad, A., Alharbi, S., Alhazzaa, O., Alagrafi, F., Alkhrayef, M., Alhamdan, Z., Alenazi, A., Al-Johi, H., Alanazi, I.O., & Hammad, M. (2016). Phylogenetic and structural analysis of the pluripotency factor sex-determining region Y box2 Gene of *Camelus dromedarius* (cSox2). *Bioinformatics and Biology Insights*, 26, 111-20.
- Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Costas, E., Rebordosa, X., & Ortega-Mora, L.M. (2003). Influence of age and purpose for testing on the cut-off selection of serological methods in bovine neosporosis. *Veterinary Research*, 34, 341-352.
- Atkinson, R., Harper, P.A., Reichel, M.P., & Ellis, J.T. (2000). Progress in the serodiagnosis of *Neospora caninum* infections of cattle. *Parasitology Today*, 16, 110-114.
- Anaya, E., Morón, C., Arias, P., Chauca, J., & Román, R. (2008). Evaluación de pruebas de Elisa e inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos IgM contra rickettsiosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25, 336-339.
- Baszler, T.V., Adams, S., Vander-Schalie, J., Mathison, B., & Kostovic, M. (2001). Validation of a commercially available monoclonal antibody-based competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibodies to *Neospora caninum* in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 3851-3857.
- Bishop, S., King, J., Windsor, P., Reichel, M.P., Ellis, J., & Šlapeta, J. (2010). The first report of ovine cerebral neosporosis and evaluation of *Neospora caninum* prevalence in sheep in New South Wales. *Veterinary Parasitology*, 170, 137-142.
- Björkman, C., & Ugglá, A. (1999). Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology*, 29, 1497-1507.
- Cabral, A.D., Camargo, C.N., Galleti, N.T.C., Okuda, L.H., Pituco, E.M., & Del Fava, C. (2009). Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 18, 14-19.
- Campero, L.M., Minke, L., Moré, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, D.P., Hecker, Y., Campero, C.M., Schares, G., & Venturini, M.C. (2015). Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47, 295-301.
- Campero, L.M., Moreno-Gonzalo, J., Venturini, M.C., Moré, G., Dellarupe, A., Rambeaud, M., Echaide, I.E., Valentini, B.S., Campero, C.M., Moore, D.P., Cano, D.B., Fort, M., Mota, R.A., Serrano-Martínez, M.E., Cruz-Vázquez, C., Ortega-Mora, L.M., & Álvarez-García, G. (2018). An Ibero-American inter-laboratory trial to evaluate serological tests for the detection of anti-*Neospora caninum* antibodies in cattle. *Tropical Animal Health and Production*, 50, 75-84.
- Cantor, A.B. (1996). Sample-size calculations for Cohen's kappa. *Psychological Methods*, 1, 150-153.
- Chávez-Velásquez, A., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Casas-Astos, E., Rosadio-Alcántara, R., Serrano-Martínez, E., & Ortega-Mora, L.M. (2004). First report of *Neospora caninum* infection in adult alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*). *Journal of Parasitology*, 90, 864-866.
- Chi, J., VanLeeuwen, J.A., Weersink, A., & Keefe, G.P. (2002). Direct production losses and treatment costs from bovine viral diarrhoea virus, bovine leukosis virus, *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis, and *Neospora caninum*. *Preventive Veterinary Medicine*, 55, 137-153.
- Conrad, P.A., Sverlow, K., Anderson, M., Rowe, J., BonDurant, R., Tuter, G., Breitmeyer, R., Palmer, C., Thurmond, M., Ardans, A.J., Dubey, P., Duhamel, G., & Bar, B. (1993). Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 5, 572-578.
- Daley, L.P., Gagliardo, L.F., Duffy, M.S., Smith, M.C., & Appleton, J.A. (2005). Application of monoclonal antibodies in functional and comparative investigations of heavy-chain immunoglobulins in new world camelids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12, 380-386.
- Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., & Ugglá, A. (1988). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192, 1269-1285.

- Dubey, J. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean Journal of Parasitology*, *41*, 1-16.
- Dubey, J., Schares, G., & Ortega-Mora, L. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Review journal Clinical Microbiology*, *20*, 323-367.
- Gondim, L.F.P., Mineo, J.R., & Schares, G. (2017). Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp, *Neospora* spp, *Sarcocystis* spp and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology*, *144*, 851-868.
- Jara, J., Chávez, A., Casas, E., Sánchez, N., Moreno-López, J., & Merza, M. (2011). Determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en la Amazonía Peruana. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *22*, 61-65.
- Pinedo, K., Chávez, A., Rivera, H., Pinedo, R., & Francisco, V. (2014). Frecuencia de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en vicuñas (*Vicugna vicugna*) de la sierra central peruana mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y ELISA indirecta. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, *25*, 70-76.
- Moore, D., Reichel, M., Spath, E., & Campero, C. (2013). *Neospora caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina. *Tropical Animal Health and Production*, *45*, 1237-1241.
- Ortega-Mora, L.M., Fernández-García, A., & Gómez-Bautista, M. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. *Acta Parasitologica*, *51*, 1-14.
- Pachaly, J. (2001). Zoología de los camélidos sudamericanos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, *4*, 81-83.
- Paré, J., Hietala, S.K., & Thurmond, M.C. (1995). Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp infection in Cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *7*, 273-275.
- Serrano-Martínez, E., Collantes-Fernández, E., Rodríguez-Bertos, A., Casas-Astos, E., Álvarez-García, G., Chávez-Velásquez, A., & Ortega-Mora, L. (2004). *Neospora* species-associated abortion in alpacas (*Vicugna pacos*) and llamas (*Lama glama*). *Veterinary Record*, *155*, 748-749.
- Serrano-Martínez, E., Collantes-Fernández, E., Chávez-Velásquez, A., Rodríguez-Bertos, A., Casas-Astos, E., Risco-Castillo, V., Rosadio-Alcantara, R., & Ortega-Mora, L.M. (2007). Evaluation of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) aborted fetuses from Peru. *Veterinary Parasitology*, *150*, 39-45.
- Soler, J.P., Moré, G., Urtizbiría, F., Hecker, Y.P., Cirone, K.M., Scioli, M.V., Paolicchi, F.A., Fiorentino, M.A., Uriarte, E.L.L., Cantón, G.J., Verna, A.E., Morrell, E.L., & Moore, D.P. (2022). Epidemic abortions due to *Neospora caninum* infection in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Parasitology Research*, *121*, 1475-1485.
- Tomassetti, M., Martini, E., Campanella, L., Favero, G., Carlucci, L., & Mazzei, F. (2013). Comparison of three immunosensor methods (surface plasmon resonance, screen-printed and classical amperometric immunosensors) for immunoglobulin G determination in human serum and animal or powdered milks. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *73*, 90-98.
- Trees, A.J., Guy, F., Tennant, B.J., Balfour, A.H., & Dubey, J.P. (1993). Prevalence of antibodies to *Neospora caninum* in a population of urban dogs in England. *Veterinary Record*, *132*, 125-126.
- Varaschin, M.S., Hirsch, C., Wouters, F., Nakagaki, K.Y., Guimarães, A.M., Santos, D.S., Bezerra, P.S.Jr, Costa, R.C., Peconick, A.P., & Langohr, I.M. (2012). Congenital neosporosis in goats from the State of Minas Gerais, Brazil. *Korean Journal of Parasitology*, *50*, 63-67.
- Vargas-Terán, M. (2005). *Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú*. Proyecto de Cooperación Técnica en Apoyo a la Crianza y Aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. FAO. 62 p.

Received April 4, 2023.

Accepted May 24, 2023.