

# UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERIAS BIOLÓGICAS Y QUÍMICAS  
PROGRAMA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**SEROPREVALENCIA DE NEOSPORA SPP. EN VACAS EN PRODUCCIÓN  
EN EL SECTOR DE CAYMA LA TOMILLA. AREQUIPA 2012**

**SEROPREVALENCE OF NEOSPORA SPP. IN DAIRY CATTLE IN THE “LA  
TOMILLA” SECTOR, CAYMA DISTRICT . AREQUIPA 2012**

**Tesis presentada por la Bachiller:**  
Andrea del Rosario Rivera Pastor

**Para optar el Título Profesional de:**  
Médico Veterinario y zootecnista

**AREQUIPA – PERÚ**

**2012**

## DEDICATORIA

Al Dios, por ser el motor que me hizo salir adelante en cada una de las etapas de mi vida.

Al mis padres por todo el apoyo brindado a lo largo de mi vida, gracias por sus consejos, por su amor, por su sacrificio y entrega.

Al mi familia por su cariño, por sus oraciones, por compartir tantos momentos conmigo.

## AGRADECIMIENTOS

Al cada uno de los doctores del programa profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UCSM por su ayuda y conocimientos brindados durante los cinco años de carrera.

Al doctor Fernando Fernández Fernández y al doctor Juan Reategui Ordoñez por la colaboración y ayuda brindada en todo momento.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

	Pág
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>04</b>
1.1 Enunciado del problema .....	04
1.2 Descripción del problema .....	04
1.3 Justificación del trabajo .....	05
1.3.1 Aspecto general .....	05
1.3.2 Aspecto tecnológico .....	05
1.3.3 Aspecto social .....	05
1.3.4 Aspecto económico .....	05
1.3.5 Importancia del trabajo .....	06
1.4 Objetivos .....	07
1.4.1 Objetivo general .....	07
1.4.2 Objetivos específicos .....	07
1.5 Planteamiento de la hipótesis .....	08
<b>II. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL .....</b>	<b>09</b>
2.1 Análisis bibliográfico.....	09
2.2 Antecedentes de investigación .....	43
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
3.1 Materiales .....	46
3.1.1 Localización del trabajo .....	46
a. Localización espacial .....	46
b. Localización temporal .....	46
3.1.2 Material biológico .....	46
3.1.3 Material de laboratorio .....	47
3.1.4 Material de campo .....	48
3.1.5 Equipo y maquinaria .....	48
3.1.6 Otros materiales .....	49

<b>3.2 Métodos</b> .....	<b>49</b>
<b>3.2.1 Muestreo</b> .....	<b>49</b>
• Universo .....	49
• Tamaño de la muestra .....	50
• Procedimiento de muestreo .....	50
<b>3.2.2 Métodos de evaluación</b> .....	<b>51</b>
a. Metodología de la experimentación .....	51
b. Recopilación de la información .....	57
• En el campo .....	57
• En el laboratorio .....	57
• En la biblioteca .....	58
• En otros ambientes generadores de la información científica .....	58
<b>3.2.3 Variables de respuesta</b> .....	<b>58</b>
a. Variables independientes .....	58
b. Variables dependientes .....	58
<b>3.3 Evaluación estadística:</b> .....	<b>58</b>
<b>3.3.1 Diseño experimental</b> .....	<b>58</b>
3.3.1.1. Unidades experimentales .....	58
<b>3.3.2 Análisis estadístico</b> .....	<b>59</b>
3.3.2.1 Análisis estadístico .....	59
3.3.2.2 Pruebas no paramétricas .....	59
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>60</b>
<b>4.1 Seroprevalencia general</b> .....	<b>60</b>
<b>4.2 Seroprevalencia según establos</b> .....	<b>63</b>
<b>4.3 Seroprevalencia según edad</b> .....	<b>65</b>
<b>4.4 Seroprevalencia según categoría productiva</b> .....	<b>67</b>
<b>4.5 Factores epidemiológicos</b> .....	<b>69</b>
<b>4.6 Pruebas parasitológicas en perros</b> .....	<b>72</b>

V. CONCLUSIONES .....	74
VI. RECOMENDACIONES .....	75
VII. BIBLIOGRAFIA .....	76
VIII. ANEXOS .....	83



## INDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1: Tabulación porcentual Seroprevalencia a <u>Neospora caninum</u> .....	60
CUADRO N° 2: Tabulación porcentual según establos .....	63
CUADRO N° 3: Tabulación porcentual según su edad .....	65
CUADRO N° 4: Tabulación porcentual según su categoría productiva .....	67
CUADRO N° 5: Tabulación de factores epidemiológicos .....	69
CUADRO N° 6: Tabulación de número de perros con <u>Neospora caninum</u> .....	72

## INDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1: Tabulación porcentual de seroprevalencia a <u>Neospora caninum</u> .....	62
GRÁFICO N° 2: Grafico porcentual según establos .....	64
GRÁFICO N° 3: Tabulación porcentual según su edad .....	66
GRÁFICO N° 4: Tabulación porcentual según su categoría productiva .....	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Fases del ciclo biológico de <u>Neospora caninum</u> .....	19
FIGURA 2: Ciclo biológico de N. caninum .....	23

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO N° 1: Fotografías .....</b>	<b>83</b>
<b>FOTO N° 1: Herdchek: anti-<i>neospora</i> .....</b>	<b>83</b>
<b>FOTO N° 2: Reactivos del kit .....</b>	<b>83</b>
<b>FOTO N° 3: Placas recubiertas con antígeno de <u>neospora</u> .....</b>	<b>84</b>
<b>FOTO N° 4: Puntas de pipetas desechables .....</b>	<b>84</b>
<b>FOTO N° 5: Sueros de bovinos .....</b>	<b>85</b>
<b>FOTO N° 6: Sueros de bovinos .....</b>	<b>85</b>
<b>FOTO N° 7: Mezclador .....</b>	<b>86</b>
<b>FOTO N° 8: Mezclador de muestras .....</b>	<b>86</b>
<b>FOTO N° 9: Agitador .....</b>	<b>87</b>
<b>FOTO N° 10: Colocación de las muestras en los pozos .....</b>	<b>87</b>
<b>FOTO N° 11: Incubación de las muestras .....</b>	<b>88</b>
<b>FOTO N° 12: Lavado de los pozos .....</b>	<b>88</b>
<b>FOTO N° 13: Conjugado antibovino .....</b>	<b>89</b>
<b>FOTO N° 14: Colocación del conjugado anti bovino en los                     pozos .....</b>	<b>89</b>
<b>FOTO N° 15: Incubación .....</b>	<b>90</b>
<b>FOTO N° 16: Lavado de los pozos .....</b>	<b>90</b>
<b>FOTO N° 17: Solución sustrato .....</b>	<b>91</b>
<b>FOTO N° 18: Solución de frenado .....</b>	<b>91</b>
<b>FOTO N° 19: Espectrofotómetro .....</b>	<b>92</b>
<b>FOTO N° 20: Lectura del espectrofotómetro .....</b>	<b>92</b>
<b>FOTO N° 21: Resultados .....</b>	<b>93</b>
<b>FOTO N° 22: Absorvancia de las muestras .....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO N° 2: Mapa de ubicación de la zona de Cayma La Tomilla.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO N° 3: Hoja de encuesta .....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO N° 4: Hoja de trabajo para la prueba de elisa directa en <u>Neospora</u>                     <u>caninum</u> .....</b>	<b>97</b>

<b>ANEXO N° 5: Reporte de resultados de laboratorio Labvetsur .....</b>	<b>98</b>
<b>ANEXO N° 6: Reporte de resultados de parasitología de laboratorio Vet Gen .....</b>	<b>102</b>
<b>ANEXO N° 7: Tabla de contingencia de Chi cuadrado .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO N° 8: Tabla de contingencia de Chi cuadrado según establos .....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXOS 9: Tabla de contingencia de Chi cuadrado según edad .....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO N° 10: Tabla de contingencia de Chi cuadrado según categoría reproductiva .....</b>	<b>106</b>





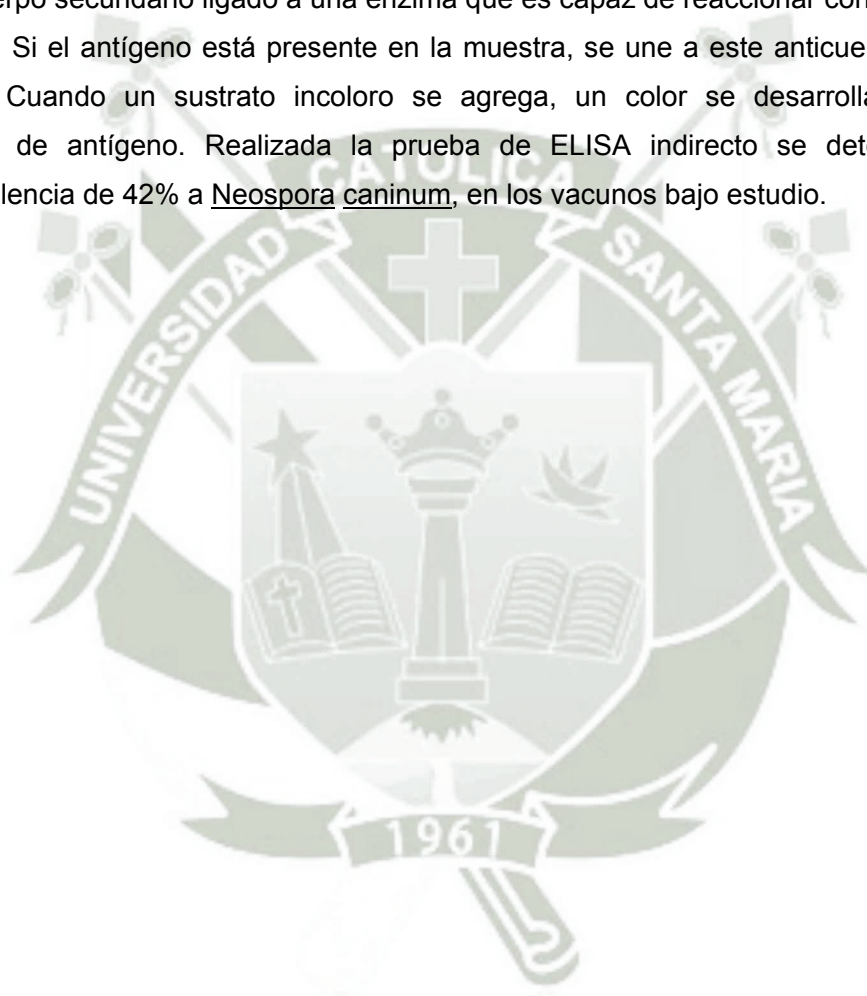
## RESUMEN

Debido a que la actividad ganadera en la zona de estudio, representa una de las fuentes principales de ingreso económico para los productores de la zona, es probable que mediante la determinación de la seroprevalencia de Neospora caninum, los productores puedan implementar una serie de medidas de control de la enfermedad, las cuales evitarán los efectos negativos del parásito en su hato así como también evitarán la transmisión del mismo en el centro de producción.

En el Perú, estudios realizados en el ganado bovino registran la presencia de Neospora caninum con prevalencias que varían entre el 30 al 57% en las cuencas lecheras de Lima y Arequipa (Andresen, 1999; Silva et al., 2002). La mayoría de estas investigaciones se han realizado en explotaciones lecheras de tipo intensivo; sin embargo, en la zona de estudio, donde la crianza de ganado es de tipo intensivo, extensivo o mixta, no existe un estudio que indique la seroprevalencia de este parásito. Por lo tanto, se diseñó el presente estudio para determinar la seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos en el sector de Cayma La Tomilla, mediante la detección de anticuerpos séricos utilizando la técnica de ELISA directa, a fin de aportar información para futuros estudios epidemiológicos relacionados a este parásito.

Con el objetivo de determinar la seroprevalencia de Neospora caninum, en el sector La Tomilla, distrito de Cayma, Provincia y Departamento de Arequipa, se tomó una muestra aleatoria de 114 animales hembras en producción de un total de 232 animales.

Las muestras serológicas se analizaron en el laboratorio de LABVETSUR- Arequipa mediante la prueba de ELISA indirecto, en la que un anticuerpo primario se lleva a cabo en las paredes de una placa de microtitulación. Cuando la muestra se sospecha que contiene el antígeno que se añade, hay una reacción antígeno-anticuerpo. A continuación, un anticuerpo secundario ligado a una enzima que es capaz de reaccionar con el antígeno se añade. Si el antígeno está presente en la muestra, se une a este anticuerpo ligado a enzimas. Cuando un sustrato incoloro se agrega, un color se desarrolla, indica la presencia de antígeno. Realizada la prueba de ELISA indirecto se determinó una seroprevalencia de 42% a Neospora caninum, en los vacunos bajo estudio.



## ABSTRACT

Because farming in the study area, is one of the main sources of income for farmers in the sector, it is likely that with the determination of the seroprevalence of Neospora caninum, producers can implement control measures, which avoid the negative effects of the parasite in the herd as well as avoid the transmission of the same in the production center.

In Peru, studies in cattle recorded the presence of Neospora caninum with prevalences ranging from 30 to 57% in the dairy areas of Lima and Arequipa (Andresen, 1999; Silva et al., 2002). Most of this research has been conducted in such intensive dairy farms, but in the study area, where cattle ranching is type intensive, extensive or mixed, there isn't a study that indicates the seroprevalence of this parasite. Therefore, this study was designed to determine the seroprevalence of Neospora caninum in cattle in the sector of Cayma La Tomilla, by detecting serum antibodies using direct ELISA technique, in order to provide information for future epidemiological studies related to this parasite.

In order to determine the seroprevalence of Neospora caninum in the La Tomilla, Cayma district, province and department of Arequipa, we took a random sample of 114 female animals in production of a total of 423 animals.

The serum samples were analyzed in the laboratory LABVETSUR- Arequipa by direct ELISA, in which a primary antibody is held in the walls of a microtiter plate. When sample suspected of containing the antigen is added, there is an antigen-antibody reaction. Then, a secondary antibody linked to an enzyme that is capable of reacting with the antigen is added. If antigen is present in the sample binds to the enzyme-linked antibody. When a colorless substrate added, develops a color indicates the presence of antigen. Made direct ELISA test found a seroprevalence of 42% to Neospora caninum in cattle under study.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Enunciado del problema

Se analizó y describió la seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros en el sector de Cayma La Tomilla. Arequipa 2012.

### 1.2 Descripción del problema

La neosporosis fue descrita en 1988 como una enfermedad neuromuscular grave en el perro, el descubrimiento de Neospora caninum como agente causal de aborto en ganado lechero y carne impulsó al desarrollo de los primeros estudios sobre esta enfermedad en la especie bovina. La importancia de la neosporosis bovina se ha incrementado notablemente, habiéndose realizado numerosos trabajos para conocer la seroprevalencia de la infección y la participación de Neospora caninum en el aborto y la mortalidad neonatal. (Jenkins et al, 2002).

La neosporosis es la principal causa de abortos en el ganado bovino en numerosos países de la región, originando pérdidas económicas cuantiosas que incluyen costos directos, alteración de los parámetros reproductivos y costos indirectos. La información sobre neosporosis en nuestra región todavía es escasa, los datos que se poseen se refieren únicamente a hallazgos esporádicos del agente etiológico o las lesiones que originan en fetos bovinos abortados, por lo que son necesarios más estudios epidemiológicos que permitan conocer la seroprevalencia, los factores de riesgo asociados a la enfermedad y la importancia económica, sanitaria y de la enfermedad.

### 1.3 Justificación del trabajo

#### 1.3.1 Aspecto general

Los reportes precedentes relacionados a la neosporosis bovina han demostrado prevalencias variables en diversas localidades de la región. Sin embargo, a la fecha se desconoce si existe la presencia del parásito en los vacunos lecheros en la zona Cayma, La Tomilla, es por ello que se plantea la presente investigación para determinar la seroprevalencia Neospora caninum en la sub zona de Cayma, la Tomilla de la campiña arequipeña.

#### 1.3.2 Aspecto tecnológico

El conocimiento de la seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros permitirá implementar medidas de bioseguridad y de manejo sanitario para el control de esta enfermedad reproductiva. Medidas conducentes a evitar la propagación del parásito a los hatos lecheros de la zona y de la campiña arequipeña.

#### 1.3.3 Aspecto social

Considerando que la ganadería lechera es una actividad socioeconómica relevante en la región de Arequipa, es probable que con la determinación de la seroprevalencia de Neospora caninum los ganaderos puedan implementar medidas de control las mismas que repercutirán en evitar los efectos negativos del parásito en su sistema de producción.

#### 1.3.4 Aspecto económico

El conocimiento racional y preciso de la prevalencia de la enfermedad aportará importante información para implementar las más adecuadas medidas de prevención del parásito y sus efectos negativos en los sistemas de producción de leche, principalmente los relacionados a abortos o problemas reproductivos.

### 1.3.5 Importancia del trabajo

La neosporosis en la ganadería lechera ha demostrado efectos muy negativos que se pueden resumir en:

- Muerte fetal temprana con repetición de celo, incremento del intervalo parto concepción o infertilidad.
- Aborto en el tercio medio de la gestación.
- Natimortos, muerte perinatal o neonatal.
- Incremento en el descarte de vacas. Las vacas infectadas tienen más probabilidad de ser descartadas por bajo desempeño reproductivo.
- Reducida producción de leche. Aunque el impacto del aborto en la producción lechera es difícil de estudiar y cuantificar, el incremento del intervalo entre partos puede reducir el número de lactancias si se considera un periodo de años. Así mismo, las vacas infectadas no abortadas han mostrado una reducción del 4% de su producción en su primera lactancia.
- Reducido valor económico de la vaca para servicio.

Se caracteriza por ser típicamente asintomática y de transmisión vertical por lo que las hembras infectadas perpetúan el parásito en generación en generación en las instalaciones ganaderas. En los casos donde se da la sintomatología clínica la principal manifestación es el aborto con las consecuentes pérdidas económicas por la reducción en la producción de leche, la muerte de neonatos y la pérdida de animales adultos. El desarrollo de la presente investigación permitirá conocer la seroprevalencia del parásito en la zona de estudio e implementar medidas de acción para su prevención y erradicación.

#### 1.4 Objetivos

##### 1.4.1 Objetivo general

- Determinar la seroprevalencia de Neospora spp. en bovinos lecheros de la zona Cayma, La Tomilla.

##### 1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros según su edad.
- Determinar la seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros según su categoría productiva.
- Determinar y estudiar cada uno de los factores epidemiológicos que se relacionan con el parásito.
- Realizar un análisis parasitológico de las heces de perros presentes en los hatos en estudio.

### 1.5 Planteamiento de la hipótesis

Dado que: Neospora caninum se le considera un importante causante de abortos en la cuenca del sur del Perú, teniendo una prevalencia en el mismo de 60%; es probable que los resultados de las muestras extraídas de las vacas del distrito de Cayma- Arequipa presenten altos porcentajes de vacas positivas a la enfermedad de neosporosis.





## II. MARCO TEÓRICO O CONCEPTUAL

### 2.1 Análisis bibliográfico

La neosporosis de los bovinos es una enfermedad parasitaria caracterizada por provocar aborto y lesiones neuromusculares en los terneros menores de 30 días. (Anderson, M.L., 2000) Aunque también puede afectar en forma natural a caninos., caprinos, ciervos, equinos y ovinos. (A.W.Layton, 2000) También se han encontrado evidencias de infección en humanos, pero aún se desconoce si en ellos puede provocar enfermedad. (J.P.Dubey, 1988).

Esta enfermedad genera pérdidas económicas directas, como también costos indirectos asociados a la asesoría veterinaria para establecer un diagnóstico, la repetición de la inseminación o cruce, aumento del tiempo de lactancia, pérdidas de producción láctea y los costos de reemplazo en caso de la eliminación de las vacas (Barr et al., 1997; Dubey et al., 2002).

#### **Antecedentes de la neosporosis**

La neosporosis se diagnosticó por primera vez en 1984 en Noruega (Bjerkas et al., 1984) como una encefalopatía mortal en perros, que parecía estar asociada a un parásito similar a Toxoplasma gondii. Sin embargo, el nuevo género Neospora no fue descrito hasta 1988 junto con su única especie representativa hasta ese momento, Neospora caninum (Dubey et al., 1988a).

Seguidamente, Dubey et al (1988b) obtuvieron el primer aislado de *N. caninum* en cultivo celular y en un ratón a partir de muestras de cerebro y músculos de origen de canino. La obtención in vitro del primer aislado de Neospora caninum permitió el desarrollo de una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico serológico de la neosporosis y, un año más tarde, Lindsay y Dubey (1989b) desarrollaron una prueba de inmunohistoquímica para la detección del parásito en tejidos animales infectados. Simultáneamente, Speer y Dubey en 1989 realizaron estudios sobre la ultraestructura de los taquizoitos, bradizoitos y quistes tisulares. Thilsed y Dubey (1989) describieron por primera vez a Neospora caninum como agente etiológico de abortos en el ganado bovino.

A partir de ese momento, las diferentes líneas de investigación centraron sus esfuerzos en estudiar los mecanismos de patogenicidad del parásito en diferentes modelos animales naturales y experimentales, así como en determinar las repercusiones de esta parasitosis en el ganado bovino mediante la realización de numerosos estudios de prevalencia en diversos casos la principal causa de aborto en el ganado bovino lechero de países de todo el mundo. Los primeros estudios sobre los mecanismos de transmisión de Neospora caninum realizados por Lindsay y Dubey (1990a, 1990b) pusieron de manifiesto la importancia de la transmisión vertical del parásito y establecieron un modelo experimental en el ratón para el estudio de la patogenia de la infección. A comienzos de la década de los 90, Anderson et al. (1991) y Ban et al. (1991a) reconocieron a la neosporosis como la California, hecho que fue apoyado por los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigadores de otros países. Desde entonces, se han multiplicado los estudios para la obtención y caracterización de diversos aislados de Neospora caninum, no solo de origen canino sino también bovino (Conrad et al., 1993a y Barr et al., 1994b). Así mismo, se han desarrollado nuevas pruebas diagnósticas indirectas, como el enzimoimmunoensayo (ELISA), la prueba de aglutinación directa (Bórkman & Uggla, 1999; Atkinson et al.; 2000b) y directas como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Lally et al.; 1996<sup>a</sup> Yamane et

al., 1996; Holmdahl y Mattson, 1996), incluyendo la PCR cuantitativa (Collantes-Fernández et al., 2002; Muler et al., 2002).

En el año 1998, se pusieron en evidencia dos de los aspectos más desconocidos de la neosporosis. Por una parte, Mc Allister et al. (1998) describieron al perro como el hospedador definitivo de Neospora caninum cerrando, de este modo, el ciclo biológico de Neospora caninum. Por otra parte, Marsh et al. (1996, 1998) propusieron una nueva especie dentro del género Neospora, Neospora hughesi, la cual originaba trastornos neurológicos en los caballos. Neospora hughesi fue aislada a partir de tejido nervioso de un caballo adulto que presentaba sintomatología nerviosa (Marsh et al., 1996; Marsh et al., 1998). Posteriormente, diversos autores pusieron en evidencia las diferencias ultra estructurales, antigénicas, genéticas y de patogenicidad existentes entre esta nueva especie y Neospora caninum (Marsh et al., 1998; Walsh et al., 2000). Sin embargo, la información disponible sobre la biología de Neospora hughesi es muy escasa. Tan solo se conocen las fases asexuales del parásito y, únicamente, se han identificado dos antígenos inmunodominantes del taquizoito de Neospora hughesi, NhSAG1 y NhSRS2, homólogos a los descritos en el taquizoito de Neospora caninum, NcSAG1 y NcSRS2 (Marsh et al., 1999). Además, se han aislado in vitro y caracterizado dos aislados de Neospora hughesi (Marsh et al., 1996; Marsh et al., 1998; Dubey et al., 2001). En relación al ciclo biológico, el caballo es, por el momento, el único hospedador natural, mientras que la infección experimental se ha logrado en el ratón, el gerbo y el perro (Walsh et al., 2000). Hasta el momento, no se han identificado las fases sexuales del parásito y se desconoce el hospedador definitivo, la prevalencia y las repercusiones clínicas de la infección.

En el año de 1991 fue considerada como la mayor causa de abortos bovinos en el Estado de California. En 1993 Conrad y Col logran reproducir la enfermedad al inocular taquizoitos en bovinos en forma experimental. Posteriormente, Barr y Col. En 1994, logran la reproducción de la muerte fetal en vacas gestantes inoculadas experimentalmente. En 1997 se aisló del tejido nervioso de caballos afectados por Neospora hughesi (Anderson 1991, Dubey 2002). Desde el punto de vista diagnóstico el mismo Bjerkas en 1991 reportó que las cepas aisladas en caninos son idénticas a las aisladas en bovinos. Con este hallazgo el desarrollo de técnicas de diagnóstico inmunohistoquímico (Lindsay, 1989) y de ELISA (Bjorkman, 1994) se amplían las herramientas diagnósticas. A pesar de los estudios realizados quedaban por definir algunos aspectos relacionados con el ciclo de vida del protozooario especialmente referentes con el huésped definitivo de la entidad, y aunque este tema fue elaborado desde 1988 por varios autores como Dubey y Col, solamente en 1998 el grupo de Mc Allister y Col, logran definir al perro como huésped definitivo al haber demostrado la presencia de ooquistes en materia fecal de animales alimentados con tejidos infectados de taquizoitos. Luego se demostró que el perro también puede ser hospedero intermediario. (Anderson-Barr 1991, Cabrera 2000).

En la historia de este protozooario merecen mención especial dos hechos, el primero es el descubrimiento del perro como el hospedador definitivo de Neospora caninum (Mc Allister et al., 1998) y, por consiguiente, la posibilidad de transmisión horizontal de la infección; y el segundo la descripción de una nueva especie, Neospora hughesi, aislada del tejido nervioso de un caballo adulto con sintomatología nerviosa y que presenta diferencias morfológicas, antigénicas y genéticas ( Marsh et al., 1996, 1998; Walsh et al., 2001).

Actualmente, la neosporosis bovina está considerada una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita y una de las causas más frecuentes de fallo reproductivo en las principales zonas productoras del mundo (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey, 1999b, 2003).

### **Prevalencia en el mundo**

A partir del año 1991 la neosporosis es reconocida entre las causas importantes de aborto en bovinos en distintos países. En regiones de Australia, E.E.U.U., Gran Bretaña, Holanda y Nueva Zelanda, el 21, 24, 34,25 y 28% respectivamente de los abortos analizados, fueron causados por esta enfermedad. En ciertas regiones de California, E.E.U.U., se le atribuye responsabilidad de hasta el 42% de los abortos analizados. (Bejerkas 1984, Cabrera 2000).

En algunas regiones las estimaciones del porcentaje de rodeos lecheros infectados y la prevalencia observada fueron: en Normandía, Francia, 64% y 6%, en Austria, España, 91% y 31%, en otras provincias del Noroeste de España, 83% y 35% y en Bahía, Brasil, 93% y 14% respectivamente. En Holanda se encontró que el 78% de los rodeos tenía reactores positivos y en Nueva Zelanda la prevalencia nacional fue de 30%. En la cuenca lechera central de Argentina, el 97% de los rodeos tuvo reactores a Neospora caninum y la prevalencia fue del 34% (Barr 1991, Bejerkas 1984, Cabrera 2000).

Actualmente, existen numerosos estudios serológicos y la infección se ha descrito en casi todas las partes del mundo, obteniéndose tasas de prevalencia de rebaño e individual elevadas, tanto en ganado de aptitud láctea como cárnica (Dubey & Lindsay, 1996; Dubey, 2003).

Neospora caninum ha sido demostrada en bovinos de las principales cuencas lecheras y en perros de establos lecheros del Perú. En vacas lecheras se encontró una seroprevalencia de 57% en Arequipa, 42.9% en Cajamarca, 29.6% en Lima y 40.38% en la provincia de Chachapoyas. En vacas con antecedentes de aborto se encontró una tasa de infección de 62.1% en Lima, y el porcentaje de fetos abortados por causa de Neospora caninum fue de 40%. (Barr 1994, Cabrera 2000).

### Características de Neospora Caninum

#### Situación taxonómica:

El Neospora caninum es un protozooario perteneciente (Lindsay 1993):

- **Sub-reino: Protozoa.**
- **Phylum: Apicomplexa.**
- **Clase: Sporozoa.**
- **Sub clase: Coccidia.**
- **Orden: Eucoccidia.**
- **Sub Orden: Eimeria.**
- **Familia: Sarcocystidae.**
- **Género: Neospora.**
- **Especie: Neospora caninum**

Neospora caninum se incluye dentro del phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeria y familia Sarcocystidae, junto con los géneros Toxoplasma, Sarcocystis, Hammondia y Besnoitia (Dubey et al., 1988a; Ellis et al., 1994).

El phylum Apicomplexa se caracteriza por tener las estructuras y organelos dispuestos en el polo anterior de estos parásitos. (Davison H.C., 1999). Las estructuras están constituidas por los anillos polares, microtúbulos internos y conoide. (Jenkins M.C., 1999). Este complejo apical es vital para el proceso de invasión de estos parásitos intracelulares (Howe D. K., 1999). Poseen complicados ciclos biológicos, con fases sexuales en huéspedes definitivos y asexuales en intermediarios. El estudio de la estructura de los apicomplejos no fue posible hasta la aparición del microscopio electrónico, que reveló la existencia de una característica exclusiva del grupo: el complejo apical ( Bjerkas 1984, Lindsay 1993).

El complejo apical es un órgano complejo situado en el polo apical del organismo, constituido por estructuras claramente diferenciadas como: uno o más anillos polares, un conoide formado por un espiral de microtúbulos, roptrias o toxonemas, numerosos micronemas y microtubos subpediculares que se extienden desde el anillo polar hasta prácticamente el polo posterior. La función del polo apical está relacionada, junto con el sistema de movimientos, con la adhesión e invasión de las células huésped. La combinación de las propiedades “perforadoras” del conoide con las secreciones químicas de las roptrias, constituyen el sistema de penetración en las células, proceso fundamental para la supervivencia y diseminación del parásito (De Irala 1997, Linday 1993).

Los integrantes de la familia Sarcocystidae se caracterizan por tener ciclos biológicos heterogéneos y formar quistes en el hospedador intermediario. Todos ellos tienen como hospedadores intermediarios a diferentes especies de herbívoros y como hospedadores definitivos a diferentes especies de carnívoros.

Estos últimos eliminan ooquistes sin esporular en las heces, los cuales, tratan esporular en el medio ambiente, presentan en su interior dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno. Cabe destacar cuatro especies estrechamente relacionadas: Neospora caninum, T.gondii, H. hammondi y H. beydorni, cuyos ooquistes tienen un tamaño similar. Sin embargo, estas especies presentan importantes diferencias tanto biológicas como estructurales, que justifican la existencia del género *Neospora* (Dubey et al., 2002a, Dubey et al., 2002b), previamente cuestionado por Mehlhorn & Herydorn (2000) y Heydorn & Mehlhorn (2002a, b).

#### **Morfología del parásito:**

En el ciclo biológico de Neospora caninum existen tres estadíos diferentes: los taquizoitos, los quistes tisulares con bradizoitos en su interior y los ooquistes (Figura 1). Los taquizoitos tienen un tamaño que oscila entre 3-7  $\mu\text{m}$  de longitud y 1-5  $\mu\text{m}$  de ancho y una morfología ovoide, globular o lunar, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren (Dubey & Lindsay, 1996). Ultraestructuralmente, los taquizoitos derivados de cultivo celular son idénticos a los observados in vivo (Speer & Dubey, 1989; Lindsay et al., 1993), poseen una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, un complejo apical formado por: 22 microtúbulos subpeliculares, dos anillos apicales, un conoide y un anillo polar; organelas secretoras compuestas por: micronemas, 8-24 roptrias y gránulos densos; mitocondria, núcleo, nucléolo, aparato de Golgi, ribosomas, polisomas, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplasmático liso y rugoso y un poro posterior (Speer & Dubey, 1989; Lindsay et al., 1993; Speer et al., 1999).



En su citoplasma se encuentran hasta 150 micronemas y de 8 a 18 roptrias. El número de micronemas es muy variable y pueden encontrarse orientados de forma perpendicular a la membrana interna. Las roptrias contienen material muy electrodenso y son de 2 a 4 veces más gruesas que las micronemas (Speer y Dubey, 1989; Speer et al., 1999). Por otra parte, Lindsay et al. (1993) demostraron que la ultra estructura de los taquizoitos de tres aislados de origen canino –NC-1, NC-2 y NC-3- era muy similar. (Bjerkas y Dubey, 1991).

Los quistes tisulares miden aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, tienen forma redondeada u oval y pueden contener en su interior hasta 200 bradizoitos.

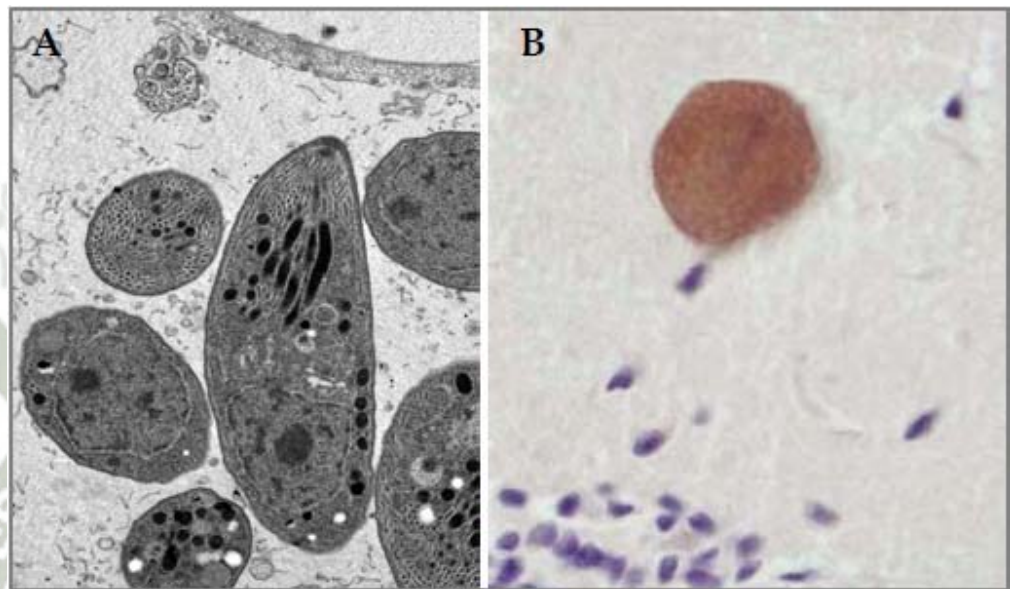
La pared quística (que puede alcanzar más de 4  $\mu\text{m}$  de espesor) está formada por dos membranas, la externa, una única membrana electrodensa, y la interna de mayor grosor, granular y con estructuras tubulares ( Bjerkas & Dubey, 1991; Dubey & Linday, 1996). La pared primaria consiste en una única membrana, la cual tiene su origen en la membrana de la vacuola parasitófora, mientras que la capa granular contiene vesículas electrodensas incluidas en una matriz electrodensa. En las fases iniciales de la formación del quiste, este presenta un tamaño de aproximadamente 17  $\mu\text{m}$  y una pared delgada regular, mientras que los quistes maduros son más grandes y su pared es más gruesa con un mayor número de invaginaciones de la pared primaria. En su interior se pueden encontrar hasta 200 bradizoitos, los cuales son delgados, miden 6-8  $\mu\text{m}$  de longitud por 1-1,8  $\mu\text{m}$  de ancho y contienen los mismos organelos que los taquizoitos, aunque en los bradizoitos el número de roptrias es menor. Por otro lado, cabe destacar la ausencia de características estructurales diferenciales entre los quistes tisulares y los bradizoitos de origen canino y bovino (Speer y Dubey, 1989; Speer et al., 199).

Los bradizoitos son de aproximadamente 6-8  $\mu\text{m}$  de longitud por 1-1,8  $\mu\text{m}$  de anchura y contienen las mismas organelas que los taquizoitos, aunque en los bradizoitos el número de roptrias es menor y tienen más gránulos de amilopectina (Speer & Dubey, 1989; Jardine et al., 1996).

Los ooquistes de Neospora caninum son morfológicamente similares a los de T. gondii y H. heydorni; tienen forma esférica o subesférica y su tamaño es de 11,7  $\mu\text{m}$  de longitud y 11,3  $\mu\text{m}$  de anchura. La pared del ooquiste es lisa, de 0,6-0,8  $\mu\text{m}$  de espesor y no contiene micrópilo. En su interior se encuentran dos esporoquistes elipsoidales (8,4  $\mu\text{m}$  de longitud por 6,1  $\mu\text{m}$  de anchura) con 4 esporozoitos cada uno (6,5  $\mu\text{m}$  de longitud por 2,0  $\mu\text{m}$  de ancho) de forma alargada y el cuerpo residual esporoquístico (Lindsay et al., 1999c).

Las fases sexual y asexual del parásito pueden completarse en el perro, si bien las fases enteroepiteliales del parásito no se han identificado hasta el momento (Dubey et al., 2002a).

**Figura 1.** Fases del ciclo biológico de Neospora caninum (A) Microscopía electrónica de taquizoitos de NC-1 en cultivo celular, (B) quiste en un cerebro procedente de un feto bovino abortado (inmunohistoquímica x 400).



Fuente: Lindsay *et al.*, 1999.

#### **Clasificación:**

##### **De acuerdo a su comportamiento**

Es obligatorio periódico, ya que el hospedero definitivo (perro) expulsa en las heces ooquistes inmaduros y estos maduran en el ambiente en un periodo de 1 a 3 días, o sea, no cumple todo su ciclo dentro del hospedero. (Anderson 1991).

##### **De acuerdo a su localización**

Es un endoparásito ya que se encuentra ubicado en el intestino tanto de perros (h. definitivo) como en el de los vacuno (h. intermediario). También se ubican en hígado, pulmón, cerebro, placenta y músculos. (Anderson 1991).

Afecta fundamentalmente a cachorros de pocas semanas de vida, que se supone han adquirido la infección por vía transplacentaria. Pueden aparecer camadas enteras afectadas y la mortalidad de los cachorros es una constante en los casos recogidos en la literatura. (Anderson 1991).

Los enfermos presentan contracturas musculares con hiperextensión y parálisis de una o ambas extremidades posteriores, polirradiculoneuritis, dolores cervicales, reflejos disminuidos, lesiones oculares (ptosis palpebral, pérdida de reflejos oculares, midriasis, nistagmos, etc.), miositis, dermatitis piogranulomatosa (sobre todo en perros de más de 10 años, en los que existe un factor de inmunocompromiso importante) etc. El final de los animales enfermos suelen ser la muerte. (Anderson 1991).

En cuanto a la infección por Neospora caninum, en adultos se han descritos solamente casos en animales sometidos a tratamientos prolongados con corticoides. (Anderson 1991).

**De acuerdo al rango del hospedero**

Es eurígeno ya que parasita tanto al perro como ha vacunos, ovinos, caprinos, entre otros (Anderson 1991).

**De acuerdo al ciclo de vida**

Es heterogéneo ya que requiere de un hospedero intermediario, en este caso vacuno o caprino u ovino, entre otros. (Anderson 1991).

**De acuerdo al tipo de reproducción**

Es heterogénico ya que realiza un ciclo de reproducción asexual en el huésped intermediario y un ciclo sexual en el huésped definitivo. (Anderson 1991).

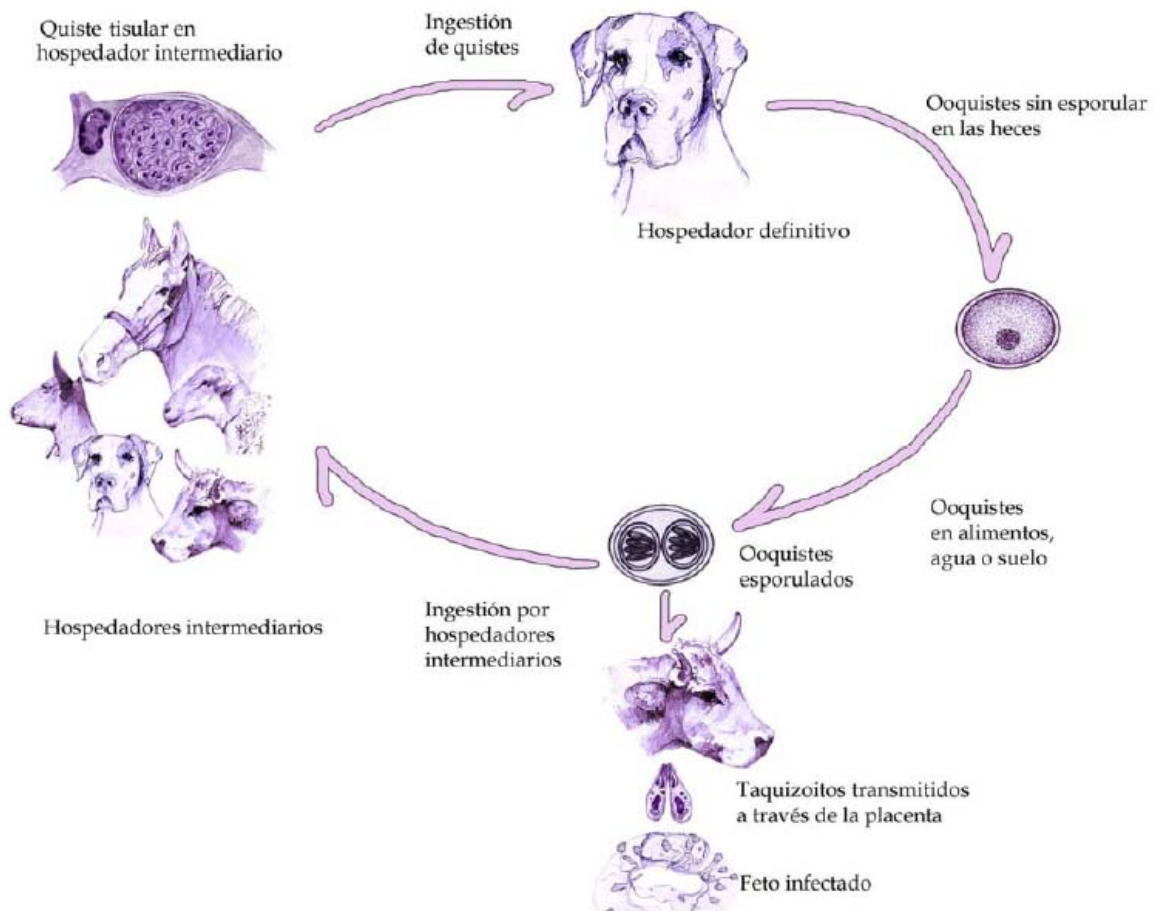
**Ciclo biológico:**

Neospora caninum tiene un amplio espectro de hospedadores domésticos y silvestres. Su presencia se ha descrito en el perro, el ganado bovino, la cabra ( Barr et al., 1992; Dubey et al., 1996), la oveja (Dubey & Lindsay, 1990), el caballo ( Lindsay et al., 1996b), el búfalo de agua (Dubey et al., 1998b; Huong et al., 1998; Guarino et al., 2000), el camello( Hilali et al., 1998), la liebre parda europea ( Ezio et al., 2003) y en alpacas y llamas ( Serrano-Martinez et al., aceptado). En animales silvestres, la infección ha sido detectada en el ciervo (Woods et al., 1994); Dubey et al., 1996), el antílope (Peters et al., 2001) el dingo (Barber et al., 1997), diversos felinos salvajes (Cheadle et al., 1999). El hospedador definitivo de Neospora caninum se descubrió en 1998; McAllister et al. (1998) identificaron ooquistes en heces de perros a los que se les habían administrado por vía oral cerebros de ratones infectados con el parásito. Los ooquistes se eliminaban sin esporular y esporulaban en el medio ambiente a las 24 horas (Lindsay et al., 1999a).

Posteriormente, Lindsay et al. (2001a) confirmaron la eliminación de ooquistes en perros que habían sido alimentados con tejido que contenía quistes tisulares procedentes de ratones. De esta manera se demostró que el perro, además de ser hospedador intermediario, actuaría como el hospedador definitivo en el ciclo biológico. Recientemente se ha logrado la transmisión cíclica de Neospora caninum entre perros y terneros (Gondim et al., 2002). Sin embargo, muchos otros aspectos de este ciclo como los estados enteroepiteliales del parásito antes de la formación del ooquiste, la excreción de ooquistes después de la ingestión de ooquistes esporulados o el papel de los carnívoros silvestres como hospedadores definitivos se desconocen.

En el caso de los hospederos intermediarios, éstos se infectarían por vía transplacentaria o por transmisión horizontal mediante la ingestión de comida o agua contaminada con ooquistes de Neospora caninum o placentas infectadas (Dubey, 2003) (Figura 2). Los taquizoitos y quistes tisulares con bradizoitos, son las fases asexuales de Neospora caninum que se encuentran en el hospedador intermediario. Los taquizoitos son los responsables de la fase aguda, multiplicándose intracelularmente por endodiogenia en muchos tipos de células, incluyendo macrófagos, neutrófilos, células neuronales, hepatocitos, fibroblastos, miocitos, células endoteliales de los vasos sanguíneos y epiteliales del riñón (Dubey et al., 1988b; Bjerkas & Presthus, 1989; Speer & Dubey, 1989; Hemphill, 1999). En fase crónica, los taquizoitos se diferencian en bradizoitos formando los quistes tisulares, localizándose principalmente en el tejido nervioso (Dubey et al., 1988b; Barr et al., 1992; Kobayashi et al., 2001). Sin embargo, recientemente, se ha detectado un quiste en el tejido muscular esquelético de un perro y de una vaca con infecciones naturales (Peters et al., 2001a). los bradizoitos en el interior del quiste tisular conservan su capacidad infectante durante periodos de tiempo prolongados ( al menos 1 año en cerebro de ratones con infección experimental), ( Lindsay & Dubey, 1990b) y pueden sobrevivir hasta 14 días a 4 °C, pero no son infectivos después 1 día a -20°C ( Lindsay et al., 1992).

**Figura 2.** Ciclo biológico de Neospora caninum



Fuente: Avances en Ciencias Veterinarias. Universidad de Chile  
<http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/viewArticle/21998/23318>

## Fases Evolutivas

### Taquizoitos

Es uno de los tres estados infecciosos de Neospora caninum y se encuentra en el huésped intermediario y forma intracelular, generalmente a nivel citoplasmático, específicamente, en la vacuola parasitófaga de la célula hospedador. Puede parasitar a un gran número de células, como: células nerviosas, macrófagos, fibroblasto, células endoteliales vasculares, miocitos, hepatocitos, polimorfonucleares y células de los túbulos renales, células dérmicas y otras células. (Anderson, 1991).

**Bradizoitos**

Los bradizoitos se dividen por endodiogénesis, en forma lenta, encontrándose dentro de los quistes celulares. Miden aproximadamente 7-8  $\mu$ , contiene los mismos organelos que el taquizoito, pero presentan un número menor de roptries. Morfológicamente son similares a los taquizoitos. (Anderson 1991).

**Quistes**

Es un estado encontrado en el hospedador intermedio. Los quistes en el tejido son ovalados o redondos y miden hasta 107  $\mu$ m de diámetro y se encuentran primariamente en el sistema nervioso central, dentro de los quistes encontramos los bradizoitos, aproximadamente miden de 50-500  $\mu$ m. Su pared lisa y gruesa (4  $\mu$ m). (Anderson 1991, Jekins 2002).

**Ooquistes****No esporulados:**

Son los eliminados en las heces del hospedador definitivo son esféricos o subesféricos, miden 10 a 11  $\mu$ m. (Anderson 1999).

**Esporulados:**

Los ooquistes esporulados, son los que después de tres días en el medio ambiente contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno, son morfológicamente similar a los ooquistes de T. gondii y Hammondia en el perro (Anderson, 1991).



En resumen, el Neospora caninum tiene formas invasivas de división rápida, los taquizoitos; formas de multiplicación lenta capaces de persistir durante años dentro de los quistes tisulares, los bradizoitos; y formas de resistencia productos de la multiplicación sexual, los esporozoitos, contenidos en los ooquistes esporulados. En el perro, los bradizoitos ingeridos dentro de los quistes tisulares invaden células del intestino, y se convierten rápidamente en taquizoitos. (Anderson 1991, Jenkins 2002).

Estos se multiplican asexualmente en forma repetida mediante endodiogenia, esta es una forma especializada de reproducción mediante la cual dos células hijas se forman dentro del parásito progenitor.

Después de algunos ciclos de división asexual, se produce en los enterocitos la multiplicación sexual que finaliza con formación de ooquistes que se descargan con la materia fecal. McAllister y col. En 1998 demostraron experimentalmente que solo unos pocos quistes de Neospora caninum eran eliminados con las heces a partir del día 8 siguiente a la infección siendo excretados irregularmente por un corto período de tiempo. Sin embargo nada era conocido con respecto a la presencia de ooquistes de heces de perros naturalmente infectados hasta Basso y col. En el 2001 encontraron ooquistes de Neospora caninum en heces de perros naturalmente infectados.(Anderson 1991, Bjerkas 1984).

La infección en el huésped intermediario se inicia por la ingestión de alimentos y agua contaminados por ooquistes. En el intestino de estas especies invaden los enterocitos y se diseminan para invadir y multiplicarse en células de distinto origen embrionario, formando a cúmulos de taquizoitos, los cuales destruyen dichas células causando daño tisular. Los taquizoitos libres penetran en las células cercanas y reinician su multiplicación transformándose en bradizoitos y en quistes tisulares son resistentes a las soluciones ácidas de pepsina, indicando que los carnívoros juegan un importante rol en el ciclo del parásito. Sólo en el sistema nervioso central y músculo se han descrito que los taquizoitos se reconvierten en bradizoitos y forman los quistes tisulares, pero los quistes

se encuentran no solo en el cerebro y músculos, sino también en médula espinal y retina. En los animales gestantes, los taquizoitos se localizan en el útero y la placenta e infectan al feto (infección congénita). El perro se infectaría cuando ingiere tejidos fetales, placentas u órganos de otras especies infectadas con Neospora caninum. (Bjerkas 1984, Bjorkman 1999).

### Relación parasito – ambiente

- **Situaciones que favorecen el parasitismo**

El uso de vacunas permitiría disminuir la ocurrencia de abortos, aunque difícilmente logren eliminar las infecciones persistentes debido a los quistes mencionados. Sin embargo esto no impide que se esté investigada la utilidad de nuevos productos químicos. (Anderson 1991, Jenkins 2002).

- **Situaciones que desfavorecen al parasitismo**

La eliminación del parásito en el bovino infectado a través de la quimioterapia o de la propia respuesta inmune post-infección se ve dificultada por la habilidad que tiene Neospora caninum para formar quistes en el tejido nervioso lo que le da protección y le permite persistir por tiempos indefinidos. (Anderson 1991, Jenkins 2002).

Los quimioterápicos, que son efectivos in vitro o parcialmente efectivos para el tratamiento en la especie canina no serían útiles para bovinos con quistes y agregarían el riesgo de contaminar la leche con residuos químicos. (Anderson, 1991).

## Respuesta inmune para *Neospora caninum*

La inmunidad contra los protozoos intracelulares es en general mediada por células dominada por respuesta linfocitaria tipo I. Tanto las respuestas tipo I y II son mediadas por distintas citoquinas de cuyo balance depende el predominio de uno u otro tipo de respuesta celular y humoral. (Mainar-Jaime, R.C., Thummond, B. Berzal-Herranz, y S. K. Hietala, 1999). Durante la infección intracelular inicial, el desarrollo de los linfocitos T-ayudantes 1 (Th1). Específicos para ciertos antígenos, es mediado por interleukina 12 (IL-12) e interferón gamma (INF $\gamma$ ). Las Th secretan IL-2, INF $\gamma$  y factor necrótico para tumores P (TNF $\beta$ ). La activación de los linfocitos Th1, promueven la respuesta citolítica y la inmunidad celular mediada por anticuerpos. En parásitos intracelulares como *T. gondii* y *Leishmania spp.* Las citoquinas generadas por una respuesta tipo 1 (Th1), es asociada a la resistencia. (Quintanilla-Goza, A., J. Pereira-Bueno, E. Tabares, E. A. Innes, R. Gonzalez Paniello, y L. M. Ortega-Mora, 1999).

Recientes investigaciones realizadas en lauchas inoculadas con *Neospora caninum*, mostraron un aumento de la morbilidad y la mortalidad cuando se neutraliza INF $\gamma$  in vivo, que la inoculación de IL-12 recombinante disminuyó la severidad de los signos clínicos tempranos y que el efecto de la IL-12 era mediado por INF $\gamma$ . Estos resultados coincidentes con otros estudios, mostraron que INF $\gamma$  es un mediador importante para la sobrevivencia y la resistencia a la infección aguda por *Neospora caninum*. Otro trabajo mostró que las células mononucleadas de sangre periférica de terneros inoculados con *Neospora caninum* fueron fuertemente estimuladas in vitro con antígeno crudo de taquizoitos, e indujeron la producción de INF $\gamma$  en abundancia. Las investigaciones actuales buscan identificar antígenos de *Neospora* capaces de inducir una producción sostenida de INF $\gamma$  y que permitan iniciar señales coestimuladoras que generen una inmunidad prolongada. Estos antígenos son los candidatos para producir vacunas. (Baszler, T.V., M.T. Long, T.F. McElwain, y B.A. Mathison, 1999).

### Características antigénicas:

La identificación, localización y caracterización de las moléculas de Neospora caninum involucradas en su interacción con los hospedadores, son necesarias para descifrar su biología, desarrollar nuevos métodos para el inmunodiagnóstico y producir inmunógenos para controlar la neosporosis. Actualmente se han descrito varias proteínas mediante el uso de diferentes técnicas. Debido a la cercanía filogénica entre Neospora caninum y T. gondii y la similitud observada entre algunas de sus moléculas, se ha iniciado el uso de una denominación común para ambos parásitos. Esto facilita la investigación con moléculas conservadas entre especies. T. gondii posee una familia de al menos 8 antígenos denominados SAG (antígenos superficiales) y SRS (secuencias relacionadas a SAG1). Neospora caninum expresa antígenos inmunodominantes, semejantes a ellos. El SAG1 de Neospora caninum, NcSAG1, es una proteína de 29/36 KDa se ubica en la superficie de bradizoitos y taquizoitos y tendría una función similar. (Bjerkas 1984, Dubey 2002a).

Si bien las proteínas de estos parásitos muestran secuencias muy conservadas, localización similar, y probablemente similar función, estas son antigénicamente diferentes (no hay reactividad cruzada entre epitopes). Un segundo grupo de proteínas localizadas en los gránulos densos de ambos géneros, se les denomina en forma genérica GRA y su función, sería la de establecer la adecuada función de la vacuola parasitófora (VP). La VP se forma durante la invasión y es derivada del parásito y de la célula hospedadora. Para Neospora caninum se han identificado NcGRA7 (33 KDa) y NcGRA6 (37 KDa), ambas asociadas a la membrana de la VP y a la red vacuolar. En gránulos densos de Neospora caninum también se aisló una potente hidrolasa (NTPasa) que posee su homóloga en los gránulos densos de T. gondii. Su función no ha sido determinada. (Bjerkas 1991, Dubey 2002a).

Una molécula relevante identificada en la superficie de los taquizoitos de *Neospora*, es una glicoproteína de 65 KDa. Se aisló mediante un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une a epitope hidrocabonato ausente en *T. gondii* y *Sarcocystis spp.* La especificidad de este mAb permitió desarrollar un ELISA de competición eficiente para el diagnóstico. (Bjerkas, 1984).

### **Inmunidad**

En condiciones naturales, sucede que los animales están sometidos a contagios reiterados y frecuentes, aunque por lo general con dosis bajas; ello hace que conforme el hospedador se va relacionando con el parásito, en aquél se desarrolla una inmunidad protectora que la previene ante las sucesivas infecciones, limitando su número, las posibilidades de multiplicación del parásito y, por ende, la capacidad de producir daño. (Cordero Del Campillo, M. 1999)

La inmunidad protectora, según se ha comprobado experimentalmente, oscila entre 3 y 9 meses, según la especie y es independiente de la existencia de quistes musculares. (Cordero Del Campillo, M. 1999)

La inmunidad celular mediada por células parece ser entonces un mecanismo importante en la resistencia del huésped hacia *Neospora*. (Cordero Del Campillo, M. 1999)

En particular las citoquinas de las células T, y el gamma interferón (IFN-g), ha sido demostrado que inhiben la multiplicación celular de la *Neospora* en cultivos celulares. La proliferación de IFN-g producido por las células T ha sido observada después de la infección de las vacas por *Neospora*. (Cordero Del Campillo, M. 1999)

La identificación en gran escala de los genes de Neospora por recientes estudios de Biología molecular provee favorable posibilidad para desarrollar una vacuna por ingeniería genética (Cordero Del Campillo,M.1999).

- **Resistencia a la enfermedad**

La habilidad del animal para resistir a la enfermedad puede dividirse en dos categorías:

- Mecanismos de defensa no específicos o nativos.
- Mecanismos de defensa adquiridos: incluyen a los glóbulos blancos fagocíticos, el interferón, el complemento, y otros tipos de leucocitos como los Linfocitos T, en especial los que se denominan células asesinas naturales. Natural Killer T. Los mecanismos de defensa adquiridos pueden dividirse en inmunidad activa, e inmunidad pasiva. La inmunidad adquirida pasivamente es cuando un animal recibe los anticuerpos de una fuente externa. La protección que da la inmunidad pasiva es inmediata, es antígeno específica, pero de vida media corta. Algunos ejemplos de inmunidad pasiva incluyen, el calostro, antitoxinas, y suero exógeno o terapia de plasma. (Cordero Del Campillo,M.1999).

La inmunidad adquirida activamente resulta de la recuperación exitosa de una enfermedad o después de una respuesta a la administración de una vacuna. La inmunidad activa adquirida se presenta cuando el animal reacciona contra un antígeno (bacterias, vi, vacuna). (Cordero Del Campillo,M.1999).

La inmunidad activa requiere tiempo para desarrollarse, es antígeno específica, y una vez establecida es de por vida. La inmunidad activa adquirida puede estar dividida en inmunidad humoral, inmunidad mediada por células, o inmunidad de las mucosas. (Cordero Del Campillo, M.1999)

Se necesitan sincronizar varios eventos para poder iniciar una respuesta inmune. Primero, necesita estar presente el antígeno (por enfermedad o por vacuna), para estimular la respuesta (la respuesta inmune es dependiente del antígeno). En segundo lugar, el antígeno tiene que estar presente ante los linfocitos adecuados. El antígeno es enfrentado por las células presentadoras de antígenos (CPA). Estas son células especializadas que se encargan de presentar a los antígenos y ellas son los macrófagos y las células dendríticas. (Cordero Del Campillo, M.1999).

Estas células juegan un papel clave en la fagocitosis, procesamiento y presentación del antígeno en un formato tal que les permite a los linfocitos responder adecuadamente. Finalmente, los linfocitos son requeridos para completar el círculo de la respuesta inmune. (Cordero Del Campillo, M.1999).

Una vez activada esta respuesta, los linfocitos específicos producen anticuerpos, o liberan citoquinas que organizan la respuesta inmune para invadir a los organismos patógenos o responder a vacunas.

La vacunación es simplemente la administración de una vacuna a un animal. No implica que el animal quedó protegido e incluso inmunizado. La inmunización ocurre cuando el animal responde a la vacunación en tal forma que la respuesta puede ser medida. (Cordero Del Campillo, M.1999)

Esta respuesta es reportada generalmente como un título o como un incremento de cuatro veces la línea base del título.

Una respuesta inmune no asegura la protección contra la enfermedad clínica. Si la enfermedad, solo puede ser controlada por una respuesta mediada por células pero solo fue estimulada la respuesta humoral, entonces el animal no está protegido. (Cordero Del Campillo, M.1999)

La protección ocurre cuando un animal desarrolla una respuesta inmune que es capaz de prevenir la enfermedad clínica después de la exposición a una cepa de campo bacteriana o viral incluyendo una vacuna. (Cordero Del Campillo, M.1999)

### **Transmisión**

Aunque el parásito se ha logrado transmitir de forma experimental por diferentes vías (intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, calostrual y oral), todas las evidencias sugieren que la transmisión vertical, principalmente vía transplacentaria y posiblemente también vía calostro, es el principal modo de contagio de la enfermedad natural siendo la infección postnatal poco importante.

La detección de anticuerpos precalostrales frente a Neospora caninum en el suero de terneros nacidos de las vacas seropositivas indica la existencia de infección intrauterina (Dijkstra et al., 2002a).



Se considera que la transmisión vertical es el modo más frecuente de transmisión de la infección en el ganado bovino y tiene, un papel muy importante en la epidemiología de la neosporosis en esta especie doméstica. Está demostrado que, una vez adquirida la infección in útero o desde el medio los animales permanecen infectados, probablemente de por vida, y pueden transmitir la infección a su descendencia en distintas gestaciones, consecutivas o no. En general, los animales infectados permanecen seropositivos aunque el nivel de anticuerpos fluctúa en relación con la presentación del aborto y durante la gestación. La existencia de la infección en determinadas líneas familiares y la ausencia aparente de transmisión horizontal observadas en la explotación, indican que el parásito puede transmitirse desde la madres infectadas a la descendencia durante varias gestaciones y que la infección puede mantenerse en las explotaciones donde la reposición de ganado propio es la norma en ausencia de un hospedador definitivo. (Dijkstra et al., 2002a).

La transmisión vía transplacentaria (que con frecuencia ocurre repetidamente en el mismo animal) se produce en animales en los que no se observa patología abortiva como en aquellos individuos que han abortado (Dubey & Lindsay, 1996), y en algunos rebaños se han señalado tasas de infección congénita que oscilan entre el 48% (Pereira-Bueno et al., 2000) y el 90% (Davison et al., 1999a). La transmisión transplacentaria se ha demostrado en infecciones experimentales no solo en el ganado bovino, sino también en la oveja (Dubey & Lindsay, 1989c; Cole et al., 1995), gato (Dubey & Lindsay, 1989a), mono (Barr et al., 1994a), cerdo (Jensen et al., 1998) y ratón (Cole et al., 1995).

Experimentalmente, se ha demostrado que la transmisión vertical por vía calostrual de Neospora caninum en los bovinos es posible durante el periodo neonatal (Uggla et al., 1998; Davison et al., 2001) siendo una posible vía de transmisión vertical en animales recién nacidos, además de la vía transplacentaria. Las implicaciones de esta posible vía de transmisión en la epidemiología de la neosporosis bovina se desconocen por el momento.

La infección posnatal en los bovinos puede tener lugar por ingestión de ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo, el perro, que contaminarían el alimento (pastos, forrajes y piensos almacenados) y el agua de bebida. Existen evidencias seroepidemiológicas que apoyarían la teoría de la infección posnatal. La presencia de seroconversión en el rebaño, junto con la falta de asociación entre los resultados positivos de serología de la madre y de su descendencia sugiere la existencia de infección posnatal, en la cual podría estar implicado el perro (Paré et al., 1997; Davison et al., 1999c; Hietala & Thurmond, 1999; Dijkstra et al., 2001a). Por otra parte, diversos estudios han sugerido la existencia de una relación entre la presentación de una curva epidémica de aborto por neosporosis en algunos rebaños y una exposición puntual a una fuente de infección externa, señalando la presencia del perro en el rebaño como un factor de riesgo implicado en la presentación de brotes de abortos asociados a la infección por Neospora caninum (Bartels et al., 1999; Wouda et al., 1999b; Mc Allister et al., 2000). El descubrimiento del perro como un hospedador definitivo para Neospora caninum puso de manifiesto la posible transmisión horizontal de la infección, ya que se detectó la eliminación de ooquistes en las heces del perro (McAllister et al., 1998; Lindsay et al., 1999a). Posteriormente, De Marez et al. (1999) y posteriormente, Trees et al. (2002) lograron detectar la infección en el ganado bovino al cual se le había administrado vía oral ooquistes de Neospora caninum eliminados por el perro. Otras posibles rutas de transmisión horizontal en el ganado bovino adulto, como la ingestión de calostro y placenta infectados por Neospora caninum, no han sido demostradas experimentalmente ya que Davison et al. (2001) no detectaron el parásito en los tejidos de los animales infectados por vía oral. Finalmente, se desconoce la posibilidad de que Neospora caninum pueda transmitirse vía venérea, ya que no se dispone de datos

sobre la prevalencia de la infección en los sementales bovinos y no se han realizado estudios para determinar la eliminación del parásito en el semen ni en infecciones naturales ni experimentales. (Bartels et al., 1999).

La infección posnatal en el perro puede tener lugar por ingestión de tejidos bovinos infectados, fetos abortados, placentas y restos de animales muertos que probablemente tendría como consecuencia la eliminación de ooquistes en sus heces que contaminarían el medio ambiente y podrían infectar el ganado. En los animales infectados, los quistes con bradizoitos están presentes principalmente en el tejido nervioso (cerebro y médula). En los quistes, los bradizoitos conservan su capacidad infectante durante periodos de tiempo prolongados (al menos 1 año en cerebro de ratones con infección experimental) y son resistentes a la acción del ácido clorhídrico y la pepsina lo que indica que el carnivorismo podría contribuir a la transmisión del parásito entre determinados hospedadores que participan en el ciclo biológico. Por otra parte, diversos autores han señalado la presencia de Neospora caninum en la placenta (Shivaprasad et al., 1989), pero únicamente, Dijkstra et al, 2002, han demostrado recientemente, que la ingestión de la placenta infectada naturalmente por Neospora caninum podría ser una posible ruta de infección entre el perro y la vaca. Sin embargo, la ingestión de fetos bovinos afectados por Neospora caninum no parece ser una importante vía de transmisión, de acuerdo con los resultados obtenidos por Bergeron et al., (2001a), en cuyo estudio los perros alimentados con fetos bovinos infectados no eliminaron ooquistes. Por otra parte, la ingestión de leche o calostro de origen bovino infectado con taquizoitos de Neospora caninum tampoco parece ser una posible vía de transmisión para el perro (Dijkstra et al., 2001b).

### Patogénesis

Aunque la patogénesis de la neosporosis en el bovino no es parcialmente conocida, se han logrado importantes avances para comprender los mecanismos involucrados en la muerte fetal o la transmisión vertical. (Schlafer DH, Fisher PJ, Davies CJ, 2000). Los bradizoitos alojados en los quistes tisulares del SNC en una hembra bovina gestantes pueden reactivarse bajo ciertas influencias hormonales e inmunológicas originando parasitemia. Al producirse parasitemia, ya sea por reactivación de quistes latentes o como resultado de una infección oral, los taquizoitos no sólo atraviesan la placenta produciendo necrosis e inflamación sino que acceden a los tejidos fetales por vía sanguínea (Venturini MC, Venturini L, Bacigalupe D, Machuca M, Echaide I, Basso W, et al, 1999). En las células infectadas del feto, se inician procesos de multiplicación mediante endodiogenia que ocasionan daño celular con necrosis e inflamación, o se forman quistes tisulares capaces de persistir durante toda la vida del animal. Mecanismos hormonales e inmunes maternos ocurridos durante la gestación, sumando al desarrollo del sistema inmune fetal actuarían determinando si la infección desencadena la muerte del feto, el nacimiento de un ternero congénitamente infectado o el nacimiento de un ternero libre de infección (Williams DJL, Guy CS, Mc Garry JW, Guy F, Tasker L, Smith RF, et al, 2000).

Aunque se ha estimado que transcurren 3-4 semanas entre la infección fetal y el aborto, la gestación puede concluir con el nacimiento de un ternero infectado, que en caso de ser hembra, transmitirá la enfermedad a su descendencia, teniendo también alto riesgo de abortar (Thurmond M, Hietala S, Blanchard PC, 1997).

La reactivación de una infección latente estaría asociada a un eficiente mecanismo de transmisión vertical más que a un proceso que desencadene el aborto, al menos en rodeos endémicamente infectados. Como contraparte, la manifestación epizootica de la enfermedad está asociada a la presentación de tormentas de abortos infectados horizontalmente. (Mc Allister MM, Huffman EM, Hietala SK, Conrad PA, Anderson ML, Salman MD, 1996a).

Las principales lesiones que se producen son en el SNC, donde se evidencia una encefalitis y a nivel de la placenta, donde se produce un proceso inflamatorio agudo con necrosis focal, lo cual afecta la interface materno-fetal. Sin embargo, no está claro si el parásito provoca daño primario en partes vitales del feto o si este daño primario es en la placenta. En vacas adultas, el principal signo es el aborto desde los tres meses de gestación siendo más frecuente entre los 4 y 6 meses. Los fetos pueden morir dentro del útero, ser expulsados, reabsorbidos, momificados, autolisados, mortinatos, nacer vivos pero enfermos o ser clínicamente sanos con infección crónica. Lo anterior dependerá del momento en que la madre se ha infectado, del tiempo en que se produce la reactivación de la infección crónica, de la magnitud de la parasitemia y de las características particulares de la cepa actuante. En la actualidad, aun no está claro si la intensidad de los signos clínicos dependen de la cepa de Neospora o de factores propios del hospedero. En terneros menores de 2 meses se describen signos como baja de peso o incapacidad para aumentar de peso. Adicionalmente, pueden evidenciarse signos neurológicos como ataxia, disminución del reflejo patelar, pérdida de la propiocepción y flexión o hiperextensión de los miembros anteriores y/o posteriores. En algunos casos puede observarse exoftalmia o asimetría en los ojos. (De Irala-1997, Lally-1996; Lindsay-1999).

### Vías de ingreso

- **Vía transplacentaria** (Transmisión Vertical)

Transmisión natural. Es la forma más común de transmisión de Neospora caninum (NC). La madre infectada transmite la infección al ternero el cual puede ser abortado entre los 4 y 6 meses, o bien producir el nacimiento de un ternero infectado que puede ser clínicamente normal o padecer de anomalías nerviosas. La infección se transmite a su descendencia. (Cordero Del Campillo, M.1999)

- **Vía oral** (Transmisión Horizontal)

El perro es el huésped definitivo por lo tanto el principal factor de difusión de la enfermedad, contaminando con su materia fecal las pasturas, aguas y alimentos donde las vacas conviven y al ingerir dichos focos de contaminación adquieren la enfermedad. (Cordero Del Campillo, M.1999)

### Formas de ingreso

Por presentar un ciclo de vida Heterógeno se tiene en cuenta solo la forma en que se transmite al Hospedero Definitivo (Cordero Del Campillo, M.1999)

### Pasiva

Los taquizoítos se localizan en distintos tejidos, pero solo forma quistes (con bradizoítos), los quistes tisulares con bradizoítos presentes en fetos, placenta y carne de animales portadores son ingeridos por el Perro el cual actúa como hospedador definitivo. (Cordero Del Campillo, M.1999)

Otro criterio también toma en cuenta al Hospedero intermediario (Transmisión Horizontal). (Cordero Del Campillo, M.1999).

El Perro actúa como hospedador definitivo, eliminando ooquistes en sus heces luego de unos pocos días esporulan los ooquistes esporulados son los que después de tres días en el medio ambiente contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno y entonces están listos para infectar, los cuales no realizan ningún tipo de esfuerzo para ingresar al bovino y a otros animales, puesto que este ingiere los ooquistes que se encuentran en los pastizales, maizales, agua o alimentos. (Cordero Del Campillo, M.1999)

### **Signos clínicos**

#### **En el ganado bovino**

La manifestación clínica más importante de la infección por Neospora caninum en el ganado bovino es el aborto en vacas gestantes. Generalmente puede producirse en cualquier época del año presentándose en forma esporádica, endémica o epidémica y tiene lugar entre el tercer y noveno mes de gestación, siendo más frecuente en torno a los 5-6 meses de gestación. Los fetos que mueren pueden ser reabsorbidos, momificarse o estar autolíticos. Los fetos abortados no suelen presentar lesiones macroscópicas características, pero algunas veces se pueden apreciar zonas blanquecinas correspondientes a zonas de necrosis e inflamación y no hay retención de placenta. En determinadas circunstancias puede producirse la momificación del feto que es abortado o bien retenido hasta el final de la gestación. La placenta suele ser eliminada con el feto abortado sin que exista retención (Dubey & Lindsay, 1996).

Lo más frecuente es el nacimiento de terneros vivos clínicamente sanos pero crónicamente infectados y con altos títulos de anticuerpos precalostarles (Anderson et al., 2000). Sin embargo, en terneros menores de 2 meses se han descrito ocasionalmente síntomas neuro-musculares, apareciendo los primeros signos clínicos a los 4-5 días después del parto, aunque estos pueden retrasarse hasta transcurridas las dos semanas. Los síntomas que se han observado van desde incoordinación ligera hasta la parálisis completa, debilidad y dificultad para levantarse. Los miembros anteriores o posteriores están flexionados o hiperextendidos y el examen

neurológico revela ataxia, disminución del reflejo patelar y pérdida de la coordinación (Barr et al., 1991b; Barr et al., 1993). En ocasiones hay exoftalmia, posición asimétrica de los ojos, ceguera, deformaciones asociadas con la lesión de las células nerviosas embrionarias, hidrocefalia, estrechamiento de la médula espinal (Dubey et al., 1990a; Barr et al., 1991b; Dubey & Lathunda 1993; Bryan et al., 1994; Locatelli-Dittrich et al., 2003).

La infección congénita con la producción de terneros infectados pero clínicamente sanos parece ser bastante frecuente y se supone que la infección persiste durante toda la vida. Estos animales son los encargados de mantener la infección dentro de los rebaños. (Holmdahl-1996, Rally-1996a)

### **En los caninos**

Los perros pueden desarrollar la enfermedad a cualquier edad, pudiendo además ser localizada o generalizada, afectando a distintos órganos. La mayoría de los casos severos ocurren en cachorros infectados congénitamente, los cuales manifiestan paresia que progresa a parálisis en los miembros traseros y los miembros anteriores pueden afectarse con hiperextensión rígida (Gasser et al., 19931; Dubey, 1993; Ruehmann et al., 1995).

Los signos neurológicos dependerán del sitio afectado y puede presentarse disfagia, parálisis mandibular, flacidez muscular, atrofia muscular e incluso falla cardíaca (Buston et al, 2002; Dubey, 2003).

Otra manifestación de la enfermedad pero menos frecuente, es la dermatitis que se ha manifestado en algunos perros (Dubey, 2003). La mayoría de los perros afectados presentan una alta carga parasitaria, con la presencia de numerosos taquizoitos, lo que puede sugerir una inmunodeficiencia asociada a diferencias entre las cepas actuantes (Dubey, 1999).



La transmisión en el perro es por ingestión de tejidos contaminados con bradizoitos provenientes de algún hospedero intermediario, con lo cual se completaría el ciclo biológico de Neospora caninum. Pero también el perro puede actuar como hospedero intermediario al consumir ooquistes en la comida o el agua (Dubey, 2003). La vía vertical también está presente en esta especie, aunque hay estudios que evidencian que esta vía de transmisión es poco efectiva para mantener la infección en los perros. (Cole et al., 1995; Dubey, 2003).

#### **Diagnóstico:**

Para el diagnóstico de la neosporosis bovina se deben analizar el feto, y los sueros del feto y de la madre. Frecuentemente, los resultados que sugieren la neosporosis como causa de aborto, cobran solidez cuando no hay indicios de la acción de otra enfermedad abortigénica. (Dubey, J. P., D. S. Lindsay, and C. A. Speer. 1998).

La identificación de *N. caninum* en los tejidos de fetos o terneros perinatales, mediante técnicas directas, ofrecen mayor certeza diagnóstico. Las técnicas directas usadas son la histopatología, inmunohistoquímica, PCR, y los aislamientos in vitro. (Dubey, J. P., D. S. Lindsay, and C. A. Speer. 1998)

El análisis histopatológico de los tejidos del fetales es uno de los más relevantes para el diagnóstico de la neosporosis. Los órganos adecuados en orden de importancia son el cerebro, corazón e hígado. Las lesiones más características de esos tejidos son las inflamaciones no supurativas. En el cerebro es característica la encefalitis necrotizante no supurativa multifocal. Es importante analizar la extensión de las lesiones y su incompatibilidad con la vida del feto. Ello se debe al elevado porcentaje de infecciones congénitas en terneros clínicamente normales. Otras protozoarios que pueden causar lesiones semejantes son T. gondii y Sarcocystis spp. Sin embargo estos son de hallazgo poco frecuente, y el primero no es considerado abortigénico en bovinos. (Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. 1999)

La inmunohistoquímica permite identificar los parásitos en los tejidos y debe sumarse a los resultados obtenidos mediante histopatología. Esta es una prueba muy laboriosa y su sensibilidad es relativa. Se deben examinar cortes de 3-5 áreas del cerebro y de otros tejidos. El hallazgo de algún quiste o acumulo de taquizoitos, define una infección congénita, pero no la causa del aborto. La reacción en cadena para la polimerasa (PCR), es una técnica de alta sensibilidad y especificidad, aunque su uso no está extendido para el diagnóstico como para la investigación. (Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. 1999).

El aislamiento de *Neospora* en cultivos in vitro permite la caracterización del parásito y es especialmente útil para los estudios epidemiológicos regionales. No es sencillo a partir de fetos abortados, lo que aparentemente depende del grado de autólisis (a la que es sensible *Neospora*), y de la abundancia y distribución del parásito en el tejido seleccionado. También se utiliza para este fin los cultivos in vivo a partir de inoculaciones de tejido sospechoso a lauchas. (Dubey, J. P., D. S. Lindsay, and C. A. Speer. 1998).

El diagnóstico de la infección por *Neospora caninum* en las vacas, se basa en el análisis del suero sanguíneo para detectar la presencia de anticuerpos específicos (técnicas indirectas). Las técnicas más usadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y las inmunoenzimáticas (ELISAs). Estas pruebas son valiosas para el diagnóstico de rodeo pero menos útiles para el diagnóstico individual, como en los casos de aborto. El hallazgo de anticuerpos contra *Neospora caninum* en vacas que abortaron no confirma que la neosporosis haya sido la causa. En rodeos donde la neosporosis es enzoótica, vacas que paren normalmente pueden ser reactoras positivas. Es recomendable analizar simultáneamente suero de vacas con y sin antecedentes de aborto, para comparar además de la presencia de anticuerpos sino también el nivel de los mismos. En la mayoría de los casos, los títulos son mayores en vacas que abortaron por *Neospora*. Esto último es más significativo en los casos de los abortos epizoóticos. La respuesta serológica difiere entre rodeos con abortos enzoóticos y los rodeos con abortos epizoóticos. En estos últimos se producen mayores

títulos en IFI. (Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. 1999) La serología fetal puede ser útil para el diagnóstico de infección congénita y abortos, junto a las demás pruebas. Sin embargo por la gran frecuencia de nacimientos de terneros normales pero con infección congénita, los resultados deben interpretarse con precaución. La ausencia de anticuerpos en fetos infectados puede deberse a la falta de inmunocompetencia (<5 meses de edad), autólisis de inmunoglobulinas o muerte antes de producir las mismas. (Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. 1999).

Sin embargo también importa en este caso, la abundancia de lesiones y/o parásitos. La sola presencia del parásito en cortes de tejidos tampoco significa que haya sido la causa del aborto, porque un elevado porcentaje de terneros con infección congénita desarrollan normalmente. (Davison, H. C., A. Otter, and A. J. Trees. 1999).

## 2.2 Antecedentes de investigación

***“Factores de riesgo asociados a la seroprevalencia de anticuerpos a Neospora caninum en ganado lechero de Aguascalientes, México 2011”.*** Conzuelo, R. et al., 2011

El objetivo del presente trabajo fue identificar potenciales factores de riesgo, incluyendo la posible presencia de contaminación del agua de bebida con ooquistes del parásito, asociados con la seroprevalencia de anticuerpos a Neospora caninum en hatos lecheros de Aguascalientes, México. Se tomaron muestras de suero sanguíneo de 150 vacas, mismas que fueron analizadas por la técnica de ELISA, se detectó la presencia de ADN de N. caninum en el agua de bebida mediante una prueba de PCR anidada, y se aplicó una encuesta para identificar diferentes características y prácticas zootécnicas de los hatos. Se calculó la seroprevalencia a la infección por N. caninum, así como la frecuencia de detección de ADN del parásito en las muestras de agua de bebida.

Se estimó la asociación entre la seroprevalencia y cada uno de los factores considerados como potenciales factores de riesgo, calculando la razón de momios (OR). La seroprevalencia a Neospora caninum fue de 30 %; se identificó ADN del parásito en el 90 % de las muestras de agua colectadas. Se identificaron a los siguientes potenciales factores de riesgo con un intervalo de confianza del 95 %: presencia de coyotes (OR= 2.40, 1.05 - 5.47, P<0.05), presencia de aves domésticas en el establo (OR= 2.32, 1.06 - 5.3, P<0.05), antecedentes de la presencia de micotoxinas (OR= 4.16; 1.41 - 13.18, P<0.05), y los antecedentes de aborto (OR= 2.13, 0.95 - 4.81, P<0.05). (Conzuelo, R. et al., 2011).

**“Seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros criados al pastoreo en la provincia de Melgar, Puno 2005”. José, A. et al., 2005**

El objetivo del presente estudio fue establecer la seroprevalencia de Neospora caninum en vacunos lecheros criados al pastoreo de la provincia de Melgar, Puno, mediante la detección de anticuerpos séricos por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Se evaluaron 419 sueros obtenidos en forma aleatoria de siete fundos ganaderos donde las prevalencias obtenidas variaron desde  $4.0 \pm 7.7\%$  hasta  $37.5 \pm 11.9\%$ . La prevalencia general fue considerada moderada ( $18.1 \pm 3.7\%$ ). Todos los fundos presentaron, al menos, un animal seropositivo. La edad y el lugar de procedencia representaron factores de riesgo en la prevalencia de la infección. (José, A. et al., 2005)

***“Prevalencia de Neospora caninum en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. 2003.” Nidia, P. et al., 2003***

La neosporosis es una parasitosis que afecta el rendimiento económico del sector ganadero al ocasionar abortos y mortalidad neonatal. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de Neospora caninum en vacas de la empresa de Sociedad Agrícola de Interés Social (SAIS) Pachacutec, ubicada en el departamento de Junín, en el año 2003. Se evaluaron 347 muestras de suero, recolectadas de vacas Brown Swiss adultas, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). El  $12.4 \pm 3.5\%$  (45/ 347) de los animales presentaron anticuerpos contra el parásito (prevalencia corregida:  $13.2 \pm 3.5\%$ ). Se observó una frecuencia mínima de 2.5% y una máxima de 19.6% en los siete hatos evaluados, sin encontrar diferencia estadística significativa. En todos los hatos se encontró, por lo menos, un animal positivo a este parásito. Estos resultados confirman la existencia de una prevalencia moderada de Neospora caninum en la zona estudiada. (Nidia, P. et al., 2003).



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Materiales

##### 3.1.1 Localización del trabajo

###### a. Localización espacial

El estudio se realizó en la zona de La Tomilla ubicado en el distrito de Cayma, provincia, departamento y región de Arequipa. Geográficamente ubicada en: 16° 23' 40" latitud sur y 71° 31' 06" longitud oeste y una altitud de 2406msnm. La zona de La Tomilla tiene una temperatura promedio de 14°C con un rango de temperatura mínima de 3°C y máxima de 23°C, y con una humedad relativa de 23% con los siguientes (Senamhi 2011).

Límites geográficos:

- Norte: Yura
- Sur: Alto Selva Alegre, Chiguata, Yanahuara
- Este: San Juan de Tarucani
- Oeste: Cerro Colorado

###### b. Localización temporal

La investigación se realizó en laboratorios LABVETSUR Y VET GEN entre los meses de Mayo a Octubre del 2012.

##### 3.1.2 Material biológico

114 muestras de suero sanguíneo de ganado bovino lechero

### 3.1.3 Material de laboratorio

#### Reactivos:

- 2 placas recubiertas con antígeno de *Neospora*.
- 30 ml de conjugado antibovino: HRPO
- 3 ml de control positivo de *Neospora*. Anti *Neospora* bovino en tampón con estabilizadores proteicos. Con azida de sodio como conservante.
- 3 ml de control negativo de *Neospora* Suero bovino no reactivo frente a *Neospora* en tampón fosfato con estabilizadores proteicos. Con azida de sodio como conservante.
- 235 ml de diluyente para la muestra, Tampones con estabilizadores Proteicos con azida de sodio como conservante.
- 235 ml de concentrado para lavado. Lavado de fosfato/Tween 10x.5 Contiene gentamicina como conservante.
- 60 ml de Substrato TMB
- 60 ml de Solución de interrupción
- 

#### Materiales:

- Pipetas de precisión para dispensar 0,005, 0,100 y 0,500 ml, o dispositivos para pipeteado múltiple.
- Puntas de pipeta desechables.
- Probeta graduada de 500 ml para la solución de lavado.
- Lector para placas de 96 pozos.
- Tubos de plástico o vidrio para diluir las muestras.

- Agua destilada o desionizada.
- Dispositivo para dispensar y aspirar la solución de lavado.
- Una fuente de vacío y un recipiente para recoger la solución aspirada.

#### 3.1.4 Material de campo

- Ropa de trabajo
- Material de sujeción para bovinos
- Registros de identificación
- Agujas
- Tubos vacutainer sin anticoagulante
- Etiquetas
- Caja térmica
- Marcador
- Hielo
- Hoja de encuesta
- Libreta de apuntes

#### 3.1.5 Equipo y maquinaria

- Centrifuga (3000 rpm)
- Gradilla
- Cámara digital
- Computadora personal



- Agitador de placas
- Estufa incubadora 37 °C
- Congeladora a – 20°C
- Cronómetro
- Lavador de placas
- Lector de ELISA
- Micropipeta de 0.5-10 µl
- Micropipeta de 50-250 µl
- Micropipeta de 300-1000 µl
- Micropipeta multisteper de 1000 µl
- Cubeta de dilución

### 3.1.6 Otros materiales

- Material de redacción
- Software estadístico: STAT MOST PARA WINDOWS VR. 3.5

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Muestreo

#### • Universo

Se ha considerado los bovinos lecheros criados en la zona, según el MINAG (2011) se considera una población aproximada de 160 vacas en lactancia en la zona de estudio.

• **Tamaño de la muestra**

El tamaño muestral fue de 114 muestras de suero que se tomaron en forma aleatoria según la fórmula de Cochran y Cox, calculada a un 95% de confianza y 5% de error.

• **Procedimiento de muestreo**

- Se procedió a la extracción de sangre por punción venosa de la vena coccígea media.
- Con una soga se sujeto al vacuno.
- Colocar la aguja de doble punta en el holder.
- Con la mano izquierda levantar cuidadosamente la cola del animal y observar las articulaciones de las vertebra caudales.
- Desinfectar el área ventral de la cola con algodón y alcohol.
- Colocar la aguja en la línea media de la cola entre la segunda o tercera vértebra coccígea.
- Acoplar el vacutainer y obtener la cantidad de sangre deseada. (4-5ml).
- Desinfectar la zona.
- Una vez obtenida la muestra se identificó, esta se coloca en una gradilla dentro del cooler, hasta la formación del coagulo.

#### a. Metodología de la experimentación

##### **METODO DE ELISA INDIRECTO PARA DIAGNÓSTICO DE Neospora SPP.**

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoabsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro.

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

- Anticuerpos marcados:
  - ELISA Directo
  - ELISA Indirecto
  - ELISA sándwich
  - Doble (DAS)
  - Heterólogo (HADAS)
- Antígeno marcado
  - ELISA competitivo

##### **ELISA Indirecto.**

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.

- Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura colorimétrica del producto final coloreado.

**Objetivo del método:**

Detección de anticuerpos contra Neospora caninum en sueros sanguíneos.

**Campo de aplicación:**

Bovinos

**Metodología:**

HerdChek: Anti-*Neospora* es un inmunoanálisis enzimático diseñado para detectar la presencia del anticuerpo contra *Neospora* en suero bovino.

Se ha creado un formato de microtitulación en el que placas de 96 pozos se recubren con antígenos de *Neospora*. Al incubar la muestra de prueba en el pozo recubierto, el anticuerpo contra *Neospora* forma un complejo con los antígenos recubiertos. Después de lavar los pozos para eliminar el material no ligado, se añade un conjugado antibovino: peroxidasa de rábano, que se une a los anticuerpos bovinos ligados a los pozos. En el paso final del ensayo, se elimina el conjugado no ligado con un lavado y se añade a los

pozos un substrato de enzima y un cromógeno tetrametilbencidina 3,3', 5,5'. El color que aparece es proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra.

### **Pasos para la realización de la prueba:**

#### **Preparación de las muestras**

Diluir las muestras a una razón de 1:100 con el diluyente para muestra (p. ej., diluyendo 5 µl de muestra con 500 µl de diluyente para muestra).  
NOTA: No diluir los controles. Cerciarse de cambiar las puntas de las pipetas con cada muestra y registre la posición de cada muestra en la placa utilizando una hoja de trabajo HerdChek. Mezclar las muestras antes de dispensar en las placas recubiertas con *Neospora*.

#### **Preparación de la solución de lavado**

Un concentrado de lavado deberá alcanzar la temperatura ambiente y agitarse para asegurar la disolución de las sales que se hayan precipitado.

El concentrado para lavado se debe diluirse 1:10 con agua destilada/desionizada antes de usarlo (p. ej., 30 ml de concentrado más 270 ml de agua por cada placa analizada).

#### **Procedimiento del test**

Todos los reactivos deberán alcanzar la temperatura ambiente antes de usarse. Los reactivos deben agitarse suavemente con movimiento circular o en un vórtex.

1. Obtener la placa (o placas) recubierta de antígeno y registre la posición de la muestra en la hoja de trabajo HerdChek.
2. Agregar 100 µl de control negativo SIN DILUIR en los pozos A1 y A2.

3. Agregar 100  $\mu$ l de control positivo SIN DILUIR en los pozos A3 y A4.
4. Agregar 100  $\mu$ l de muestra DILUIDA en los pozos apropiados. Todas las muestras deben analizarse en duplicado.
5. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Aspirar el líquido de todos los pozos y deséchelo en un recipiente para desechos apropiado.
7. Lavar cada pozo 4 veces con aproximadamente 300  $\mu$ l de solución de lavado tamponada con fosfato. aspire el líquido de los pozos después de cada lavado. Evite que las placas se sequen entre cada lavado y antes de agregar el conjugado. Después de la aspiración de lavado final, golpear la placa suave pero firmemente para transferir el líquido residual al material absorbente.
8. Agregar 100  $\mu$ l de conjugado antibovino:HRPO en cada pozo.
9. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Repetir los pasos 6 y 7.
11. Agregar 100  $\mu$ l de solución de sustrato TMB en cada pozo de la placa.
12. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
13. Agregar 100  $\mu$ l de solución de frenado en cada pozo de la placa para detener la reacción.
14. Hacer el blanco en el espectrofotómetro con aire.
15. Medir y registre la absorbancia a 650 nm.
16. Calcular los resultados.

### **Conservación**

Todas las contra muestras de cualquier suero deben ser almacenadas en viales (eppendorf) de 2 ml en congelación (-20°C). Sueros con importancia epidemiológica serán guardados para fines de investigación.

### **Almacenamiento**

Para almacenar el material biológico usar siempre viales de buena calidad con tapas de rosca y una cinta selladora que asegure el cierre hermético, previo al almacenamiento deberán ser identificados y desinfectados externamente con el desinfectante de uso.

### **Eliminación**

Manejar las muestras como material biológico no infectado, mantener los envases de muestras cerrados y sellados hasta su disposición final. Una vez procesada la muestra, desinfectar químicamente y eliminar en un basurero de desechos.

### **Cálculo y expresión de resultados**

Para que el ensayo sea válido, la diferencia (P-N) entre el promedio del control positivo (PC  $\bar{X}$ ), y el promedio del control negativo (NC  $\bar{X}$ ) tiene que ser mayor o igual que 0,150. Además, el NC  $\bar{X}$  debe ser menor o igual que 0,20.

Si el ensayo no es válido, debe sospecharse que hubo un error en la técnica y debe repetirse el análisis después de leer minuciosamente el prospecto del producto.

La presencia o ausencia de anticuerpo contra *Neospora* se determina al calcular el cociente de muestra con respecto al control positivo (S/P) para cada muestra. El control positivo se ha normalizado y representa una cantidad considerable de anticuerpo contra *Neospora* en suero bovino.

### Interpretación de los resultados

- Las muestras de suero con cocientes S/P menores que 0,50 se clasifican como NEGATIVAS hacia los anticuerpos contra *Neospora*.
- Si el cociente S/P es mayor o igual que 0,50, las muestras se clasifican como POSITIVAS hacia los anticuerpos contra *Neospora*.

### Cálculos

1. Cálculo del promedio del control negativo (NCx)

$$NC \bar{X} = \frac{A1 A(650) + A2 A(650)}{2}$$

2. Cálculo del promedio del control positivo (PCx)

$$PC \bar{X} = \frac{A3 A(650) + A4 A(650)}{2}$$

3. Cálculo del cociente (S/P)

$$S/P = \frac{\text{Muestra } A(650) - NC \bar{X}}{PC \bar{X} - NC \bar{X}}$$

### MÉTODO DE FLOTACIÓN DE MAC MASTER MODIFICADO, CON SOLUCIÓN SALINA SOBRESATURADA

Se utiliza para detectar y cuantificar ooquistes y huevos por gramos de materia fecal. Se coloca solución saturada de NaCl a la probeta del equipo, son 28 ml de solución más 2 gr de heces medidos por el desplazamiento de 2 ml, que hacen un volumen total de 30 ml. El compartimento delimitado de la cámara miden 1 cm cuadrado, cada compartimento tiene seis divisiones. El fondo de la cámara mide 1.5 mm por cada lado que dan un total al sumar de 30 ml.



**Materiales:**

- Equipo de Mac Master (cámara y probeta)
- Solución saturada de NaCl
- Coladera de malla fina
- Cucharas
- Goteros o pipeta
- Microscopio

**Técnica:**

- Se coloca 28 ml de NaCl saturado y se agregan los 2 gr. de heces.
- Se mezcla con ayuda de un mortero y se pasa a través de un tamiz.
- Se toma con el gotero la cantidad suficiente para llenar el compartimento de la cámara.
- Se deja reposar la cámara por cinco minutos para permitir el ascenso de los huevos.
- Se observa al microscopio con el objetivo 10x.
- Se hace la conversión para obtener el resultado de número de huevos por gramos de heces.

**b. Recopilación de la información**

- **En el campo**

Entrevistas y encuestas a los ganaderos, obtención aleatoria de muestras de sangre de los animales sorteados.

- **En el laboratorio**

Método de ensayo de ELISA indirecta para diagnóstico de Neospora caninum.

Método de flotación de Mac Master modificado, con solución salina sobresaturada para el análisis parasitológico de las heces de perros.

- **En la biblioteca**

Revisión de libros relacionados a temas, análisis y revisión de revistas científicas especialidades.

- **En otros ambientes generadores de la información científica**

Internet y páginas web relacionadas al estudio. Intercambio de información con profesionales especialistas en el área.

### 3.2.2 Variables de respuesta

#### a. Variables independientes

- Edad y categoría del animal
- Presencia de perros en el hato

#### b. Variables dependientes

- Muestra de suero con reacción positiva/negativa a la prueba serológica
- Muestra de heces con reacción positiva/negativa al examen coprológico.

### 3.3 Evaluación estadística:

#### 3.3.1 Diseño experimental

##### 3.3.1.1. Unidades experimentales

Cada vacuno muestreado es considerado una unidad experimental determinando la edad y categoría. Considerando se encuentran en iguales condiciones de manejo y alimentación dentro del área de influencia de la presente investigación.

### 3.3.2 Análisis estadístico

#### 3.3.2.1 Análisis estadístico

Considerando la positividad de los sueros a la prueba serológica, los resultados se expresaron en porcentaje con su respectivo intervalo de significancia.

La prevalencia se estimará utilizando la siguiente fórmula:

$$P = \frac{N^{\circ} \text{muestras positivas}}{N^{\circ} \text{total de muestras}} \times 100$$

Luego los resultados serán ingresados a una base de datos considerando las variables edad y presencia de perros.

#### 3.3.2.2 Pruebas no paramétricas

Se uso para el análisis de las frecuencias observadas contrastándolas con las frecuencias esperadas de un análisis de chi cuadrado a un nivel de significancia de 0.05 cuya fórmula es la siguiente:

$$x^2 = \frac{\sum (fo - fe)^2}{fe}$$

Donde:

X<sup>2</sup>=chi cuadrado

Fo= frecuencia observada

Fe= frecuencia esperada

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1 Prevalencia general

En el cuadro y gráfica N° 1 se muestra la tabulación porcentual de la seroprevalencia de Neospora caninum observada en el distrito Cayma La Tomilla.

CUADRO N° 1

Tabulación porcentual Seroprevalencia a Neospora caninum

	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
N°	47	67	114
%	41%	59%	100%

$\chi^2 = 3.5087$ ,  $gl=1$  y  $\alpha=0.05$

Fuente: propia del trabajo

Podemos observar que de 114 muestras 47 son seropositivas a Neospora caninum lo que representa un 41% de prevalencia a dicha parasitosis.

La seroprevalencia encontrada en el presente trabajo es similar cuando se compara al 40% en Chachapoyas- Amazonas (Quevedo 2003), y mayor al 18.1% en Melgar-Puno (Atocsa 2005); al 28,7% en Sama Inclán – Tacna (Cahuana 2006); al 32.7% en el Valle de Lima (Del Campo 2003) ; al 13.2% en Sais Pachacutec. Junín (Casas y Flacón-2003); por otro lado es menor a comparación del 57% en Santa Rita- Arequipa (Andersen, 1997); 50% en Cajamarca (Cabrera 2000); 51% en las secciones A-B-C-D y E de la Irrigación Majes-Arequipa (Castro-Quiroz 2000).

Ribeiro *et al.* (2008), han propuesto que la neosporosis en los bovinos puede tener prevalencias distintas en función de las diferentes condiciones climáticas en donde se localicen los animales.

Un factor de riesgo que estaría involucrado en el incremento de la seroprevalencia de Neospora caninum podría ser la presencia de animales portadores. Davison *et al.* (1999) señalaron la transmisión vertical como una vía de transmisión para el mantenimiento de la infección; así mismo, Williams *et al.* (2003) demostraron que vacas infectadas crónicamente transmiten el parásito a través de la placenta, y que los fetos pueden ser abortados o quedar congénitamente infectados. Esta situación se puede repetir en varias gestaciones y algunas vacas pueden abortar más de una vez.

Una fuente importante de infección que puede hacer que el porcentaje de seroprevalencia en la zona de estudio represente un 41% es el agua de bebida que se proporciona a los animales, la cual proviene del río, y esta durante su cauce se ve seriamente contaminada por perros vagabundos los cuales defecan muy cerca de este.

La presencia de palomas en los hatos de la zona, también puede influir con este porcentaje, ya que estas se encuentran deambulando libremente en los predios. Recientemente, se ha reportado que estas son huéspedes intermediarios naturales de Neospora caninum, mientras que previamente otros estudios han reportado como factor de riesgo la presencia de aves al asociarse con episodios de abortos epidémicos. Sin embargo el papel epidemiológico de esta situación así como de la convivencia entre estas aves, incluyendo a pájaros residentes o migratorios, y el ganado debe investigarse con más detenimiento.

Otro fuente de infección puede radicar en el alimento que se le brinda al animal el cual muchas veces está contaminado, el 100% de los hatos en estudio compran el silaje con el que se alimenta a los animales, este puede venir ya contaminado con ooquistes de neospora y debido a la resistencia de estos frente a las condiciones adversas del medio ambiente, hace que al momento que se suministra el ensilado a los animales estos sean

consumidos, siendo de esta manera un modo de transmisión de neosporosis.

### GRÁFICO N° 1

#### Seroprevalencia a Neospora caninum



Fuente: propia del trabajo

## 4.2 Seroprevalencia según establos

En el cuadro y gráfica N° 2 se muestra el resultado de seroprevalencia a Neospora caninum según el establo de estudio.

CUADRO N° 2

### Tabulación porcentual según establos

Establo	Positivo	%	Negativo	%	Total
Establo 1	8	42	11	58	19
Establo 2	26	43	35	57	61
Establo 3	4	27	11	73	15
Establo 4	9	47	10	53	19
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>41</b>	<b>67</b>	<b>59</b>	<b>114</b>

$X^2 = 1,6632$ ,  $gl=3$  y  $\alpha=0.05$

Fuente: propia del trabajo

Podemos observar que la seroprevalencia varía entre un 27% a 47% según el establo, afirmamos que el establo 4 presentó 9 animales seropositivos lo que indica un 47% de seroprevalencia siendo este valor el más alto comparado con los otros establos en estudio, así mismo afirmamos que el establo 3 presentó 4 animales seropositivos lo que indica un 27% de seroprevalencia siendo este el valor más bajo.

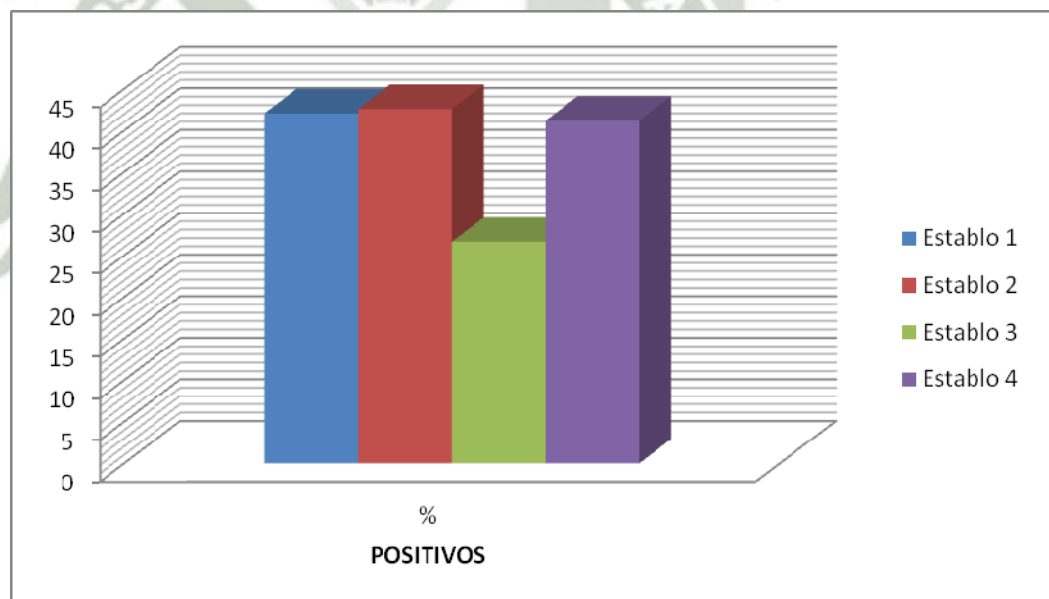
Estas diferencias podrían deberse al tipo de manejo animal y a la presencia del hospedero definitivo en las zonas de pastoreo, ya que la mayoría de estos, presentan un sistema extensivo, en donde los animales salen al pastoreo, movilizándose por diferentes terrenos de la zona.

La mayoría de los fundos en estudio practican el sistema de hatos abiertos, es decir, que introducen animales de reemplazo; y es posible que la infección se haya establecido en la zona con la llegada de animales infectados con neosporosis procedentes de zonas con prevalencias altas; así también en el caso de fundos donde su sistema es cerrado, es decir, que los reemplazos utilizados provienen del mismo sistema de crianza es posible que un porcentaje de la recria utilizada,

se encuentre infestada, ya que provienen de vientres crónicamente infectados. La informalidad y ausencia de un control sanitario básico en la adquisición del ganado habrían facilitado el ingreso de esta infección.

La seroprevalencia en los 4 establos estudiados en la zona de Cayma la Tomilla es mayor comparado con un estudio realizado en la comunidad de Corpacancha SAIS Pachacutec, Junin (2003), en donde se encontró una seroprevalencia de 02.6%; 11.2%; 11,4%; 20.2%; 18.3%; 09.9% y 18.9% en los establos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. (Andresen, 1999; Silva et al.; 2002).

**GRÁFICO N° 2**  
**Gráfico porcentual según establos**



Fuente: propia del trabajo

Al análisis estadístico no paramétrico con la prueba de Chi cuadrado (Anexo Nro.8) no existe diferencia estadística ( $p > 0.05$ ) entre las frecuencias observadas y esperadas para el diagnóstico de seroprevalencia de Neospora caninum según el establo de procedencia de las unidades experimentales.



### 4.3 Seroprevalencia según edad

En el cuadro y gráfica N° 3 se muestra la seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos en producción del sector Cayma La Tomilla según su edad

**CUADRO N° 3**

**Tabulación porcentual según su edad**

Edad	Positivo	%	Negativo	%	Total
2-3 años	10	29	25	71	35
4-5 años	23	52	21	48	44
6 a más	14	40	21	60	35
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>-</b>	<b>67</b>	<b>-</b>	<b>114</b>

$\chi^2 = 4,5507$ ,  $gl=2$  y  $\alpha=0.05$

Fuente: propia del trabajo

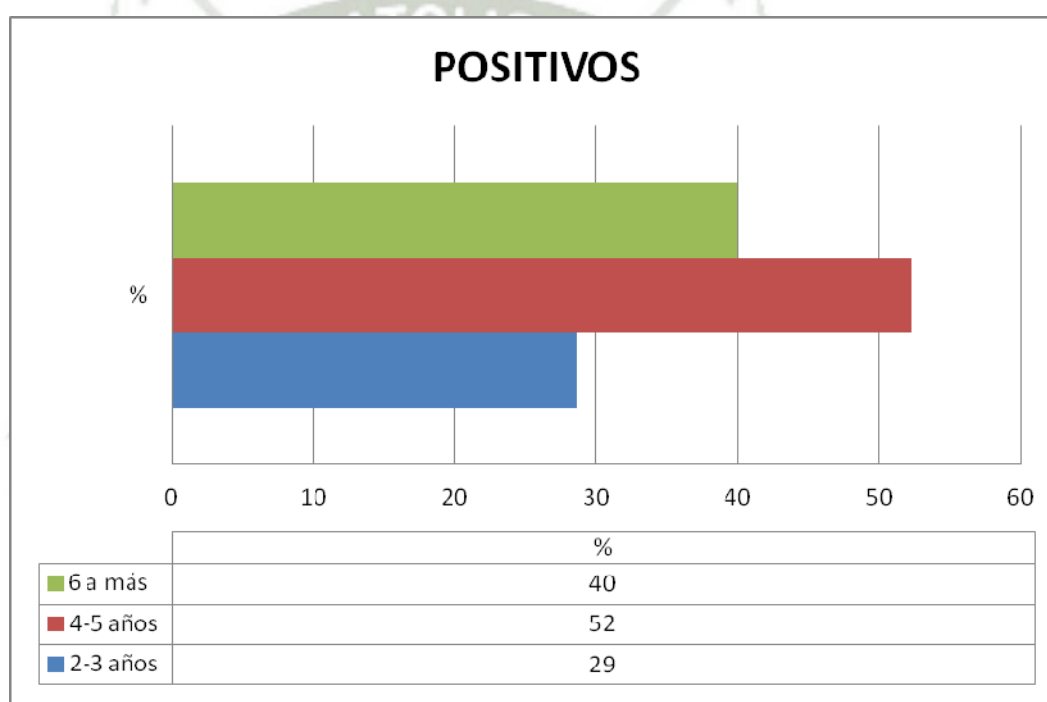
En el cuadro N° 3 podemos observar que existe una frecuencia observada de 10 casos positivos que corresponde a una seroprevalencia de 29% para vacas jóvenes de 2 a 3 años de edad hasta una frecuencia observada de 23 casos positivos que corresponde a una seroprevalencia de 52% en vacas de 4 a 5 años de edad.

José Atocsa H., Amanda Chávez V., Eva Casas A. y Néstor Falcón P realizaron un estudio en la provincia de Melgar, Puno; en el cual indican que la edad de los bovinos en estudio representaron factores de riesgo para la presentación de la enfermedad, obteniendo los siguientes resultados, una seroprevalencia de 21.1%; 20%; 19.1%; 15% en bovinos de 1.5-2.5 años; 2.5-3.5 años; 5.5-4 años ; y mayor a 4 años respectivamente, encontrándose una mayor seroprevalencia en animales de 1.5 – 2.5 años, es decir los más jóvenes, mientras que en el presente estudio se encontró una mayor seroprevalencia en animales de 4 a 5 años de edad.

Probablemente las diferentes categorías de animales hayan sido expuestas a diferente fuente de infección, ya que se esperaría que si todas las categorías de animales hubieran sido expuestas simultáneamente a una misma fuente de infección los animales deberían presentar la misma prevalencia debido a que no se conoce, hasta el presente, que el factor edad predisponga a la enfermedad.

### GRÁFICO N° 3

Gráfico porcentual según edad



Fuente: propia del trabajo

Al análisis estadístico no paramétrico con la prueba de Chi cuadrado (Anexo Nro.9) existe diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre las frecuencias observadas y esperadas para el diagnóstico de seroprevalencia de Neospora caninum según la edad del vacuno.

#### 4.4 Seroprevalencia según categoría productiva

En el cuadro y gráfica N° 4 se muestra la tabulación porcentual de la seroprevalencia de Neopsoa canimun en vacas en producción de la zona de Cayma La Tomilla según su categoría productiva.

**CUADRO N° 4**

**Tabulación porcentual según su categoría productiva**

N° de lactancia	Positivo	%	Negativo	%	Total
1era lactancia	11	31	25	69	36
2da lactancia	15	54	13	46	28
3era lactancia	8	44	10	56	18
4ta lactancia	6	50	6	50	12
Más de 5ta lactancia	7	35	13	65	20
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>-</b>	<b>67</b>	<b>-</b>	<b>114</b>

$\chi^2 = 4.2309$ ,  $gl=4$  y  $\alpha=0.05$

Fuente: propia del trabajo

En el cuadro N° 4 se observó que existe una seroprevalencia según el número de lactancias de las vacas en estudio que varía de un 31% que la presentan los animales de primera lactancia a un 54% que la presentan las vacas de segunda lactancia.

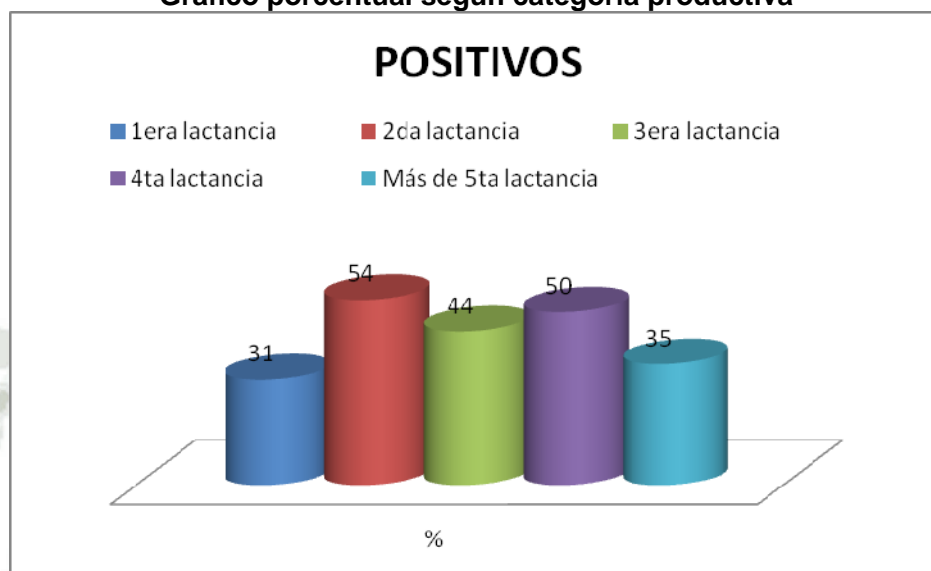
Las vacas de primera lactancia mostraron una menor seroprevalencia que las que contaban con más lactancias; en la literatura se informa que los animales de mayor edad generalmente muestran seroprevalencia más elevada pues tienen más posibilidades de tener contacto con el parásito.

Conzuelo, R. *et al* (2011) en un estudio realizado en México determinaron la seroprevalencia a esta enfermedad según la categoría productiva de los bovinos de la zona de estudio encontrando los siguientes resultados un 23%, 35%, 31% y 34% en vacas de primera, segunda, tercera y cuarta lactancia respectivamente, teniendo como resultado la mayor seroprevalencia en bovinos de segunda lactación, resultado que es similar a la seroprevalencia encontrada en los bovinos sometidos al presente estudio realizado en el sector de Cayma La Tomilla donde también se

encontró la mayor seroprevalencia en animales de esta categoría productiva.

**GRÁFICO N° 4**

**Gráfico porcentual según categoría productiva**



Fuente: propia del trabajo

Al análisis estadístico no paramétrico con la prueba de Chi cuadrado (Anexo Nro.10) existe diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre las frecuencias observadas y esperadas para el diagnóstico de seroprevalencia de Neospora caninum según el número de lactancia como indicador de categoría productiva. Asimismo existe asociación estadística ( $p < 0.05$ ) entre muestras serológicas según número de lactancia o categoría productiva.

#### 4.5 Factores epidemiológicos

En el cuadro N° 5 se muestra los resultados de la encuesta realizada a los propietarios de los establos de estudio en donde se dan a conocer los factores epidemiológicos que rigen a la enfermedad.

**CUADRO N° 5**

**Tabulación de factores epidemiológicos**

ITEM	Alternativas
Abortos mensuales	1 ( 4 ) 2 ( 0 ) 3 ( 0 ) 4 ( 0 )
Identificación del feto	Macerado ( 4 ) Momificado ( 0 ) Malformaciones congénitas ( 0 )
Vacunación del ganado	si ( 4 ) no ( 0 )
Persona que vacuna al ganado	SENASA ( 2 ) Su médico veterinario ( 2 ) Algún laboratorio ( 0 )
Número de perros	1 ( 0 ) 2 ( 1 ) 3 ( 1 ) 4 ( 0 )

Fuente: propia del trabajo

En el cuadro N° 5 podemos observar que el 100% de los establos encuestados presentan 1 aborto mensual; que un mayor porcentaje de los fetos eliminados por los animales se identifican macerados, que el 100% de los establos cuentan con un protocolo de vacunación el cual en un 50% es realizado por SENASA y en otro 50% es realizado por los médicos veterinarios encargados del hato, por ultimo podemos observar que el 50% de los establos cuentan con perros y el otro 50% cuentan por lo menos con 2 perros.

Anderson afirma que la infección por Neospora caninum no es suficiente para que se produzcan los abortos. La etiología de la neosporosis debe considerarse multicausal. De otro modo no podría explicarse que el 80% de las vacas infectadas no aborta en un ciclo reproductivo. Estas causas, aún no definidas, dependerían de la interacción de factores ambientales o atributos de la madre y del feto o ambos, con Neospora caninum. También se ha observado que la incidencia de abortos aumenta con la edad, lo que

puede estar relacionado al nivel de producción. Esto podría explicar la baja presentación de abortos en los establos en estudio, la cual es de 0 a 1 aborto mensual.

Anderson también nos dice que los abortos por Neospora, pueden ocurrir desde los 3 meses de gestación hasta su término. Otra manifestación de la neosporosis es la momificación de los fetos que mueren durante etapas tempranas; característica que no se observó en los hatos analizados ya que el 100% de los fetos abortados se identificaron macerados.

Al hablar de factores epidemiológicos se toman en cuenta los siguientes: el hospedero, el medio ambiente y el parásito, la combinación de estos tres dan lugar a condiciones necesarias para que se pueda desarrollar la enfermedad en el animal.

En cuanto a los factores dependientes al hospedero podemos mencionar a la edad. En relación a la edad de los animales los datos que existen hasta el momento son controvertidos. En general, no se observan diferencias en la tasa de seroprevalencia de la infección por Neospora caninum en relación con la edad de los animales lo que indica que la infección en los rebaños se mantiene, principalmente, por transmisión vertical. (Paré *et al.*, 1996; Wouda *et al.*, 1998b).

Otro factor relacionado con el hospedero tenemos a la inmunidad, cualquier cambio en el equilibrio inmunológico puede influir de forma determinante en la relación parásito-hospedador originando enfermedad o muerte del feto. En el ganado bovino la eficacia de la respuesta inmune materna, así como la capacidad del feto para desarrollar una respuesta inmune frente al parásito son factores determinantes en el progreso de la infección y, por consiguiente, en sus manifestaciones clínicas.

Dentro de los factores dependientes del parásito que pueden influir en el desarrollo de la infección destacan la dosis infectante, el estadio parasitario y la presencia de infecciones concurrentes (Innes *et al.*, 2000a, b).

A dosis bajas se produce una enfermedad crónica asociada, en algunos casos, a sintomatología nerviosa como consecuencia de las lesiones presentes en el tejido nervioso, por el contrario a dosis elevadas de taquizoítos empleadas en la infección se da el incremento de la tasa de mortalidad y presencia de lesiones graves en los diferentes tejidos estudiados.

El estadio parasitario se basa en la determinación de la etapa en que el parásito produce mayor infestación la cual se basa principalmente por la acción de los taquizoítos, otro estadio del parásito que se ha empleado en las infecciones experimentales son los quistes tisulares con bradizoítos administrados vía oral.

Entre los factores de riesgo de aborto asociado a la infección por Neospora caninum hay que considerar la existencia de infecciones concurrentes por otros patógenos, agentes inmunosupresores o factores hereditarios-predispongan al aborto de fetos infectados por Neospora caninum.

Y por último tenemos los factores dependientes del medio ambiente, en general, los abortos de fetos infectados por el parásito se presentan en cualquier época del año aunque, en ocasiones, se ha observado una mayor frecuencia de presentación en los animales con infección crónica durante algunos meses otoño e invierno, principalmente debido, probablemente, a factores inmunodepresores que predominan durante este periodo relacionados con la alimentación y el estrés (Thurmond *et al.*, 1995). En el caso de posibles infecciones postnatales vía ingestión de ooquistes la infección de los animales en zonas templadas y los abortos por esta causa serían también más frecuentes durante los meses de otoño-invierno ya que, probablemente, la viabilidad de los ooquistes en el medio disminuiría notablemente durante la estación seca y cálida.

#### 4.6 Prueba parasitológica en perros

En el cuadro N° 6 se muestra los resultados obtenidos del análisis parasitológico que fueron sometidos los perros de los establos en estudio.

**CUADRO N° 6**

**Tabulación de número de perros con Neospora caninum**

Establo	N° Perros	Positivo	Negativo
Establo 1	0	-	-
Establo 2	3	-	3
Establo 3	0	-	-
Establo 4	2	-	2
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>-</b>	<b>5</b>

Fuente: propia del trabajo

En el cuadro N° 6 podemos observar que el 100% de los perros con los que cuentan los establos en estudio son negativos al análisis coprológico de Neospora caninum.

El mantenimiento de la infección por Neospora caninum en los hatos generalmente está asociada no solamente con la transmisión vertical, sino también con la horizontal; el estado endémico y la elevada seroprevalencia en un hato o en una región sólo pueden explicarse por la acción simultánea de ambos mecanismos de transmisión, en donde la presencia de ooquistes excretados por el huésped definitivo representan la fuente de infección al ser ingeridos por los bovinos a través de agua y otros alimentos; algunos estudios han sugerido que la contaminación con ooquistes del agua de bebida y forraje pueden ser la causa de una infección reciente por Neospora caninum en brotes epidémicos de abortos.

En este estudio realizado se encontró que los perros que se encuentran en los hatos están libres de la infestación de Neospora caninum, lo que no nos hace excluir al perro como principal portador de la enfermedad, siendo causa principal de la transmisión horizontal de la misma, ya que se observó la presencia de perros vagabundos en la zona, los cuales tienen contacto con los animales cuando estos salen al pastoreo, así mismo estos tienen



libre acceso a los fundos, ya que estos ingresan a los hatos en busca de comida o resguardo.

La contaminación con heces fecales de perros, y por tanto con ooquistes viables puede realizarse de diversas formas, principalmente por el viento, y no necesariamente por el depósito de heces contaminadas en el agua o en los alrededores de los depósitos de la misma.

La región de estudio posee un clima semiárido, en el cual la radiación solar intensa así como las altas temperaturas que se presentan durante el día, desecan en poco tiempo la materia fecal, así que el excremento de caninos vagabundos puede fácilmente ser transportado como partículas suspendidas por el aire; los depósitos de agua de bebida son abiertos, al igual que los pastos consumidos, siendo susceptibles de ser receptáculos de las partículas de polvo transportadas por el viento.

La presencia de perros vagabundos contaminados en la zona de estudio se puede relacionar con la transmisión de la enfermedad por el papel del perro como hospedador definitivo de Neospora caninum. La transmisión horizontal, se basa en la eliminación fecal de ooquistes sin esporular por el perro, los cuales son consumidos por los animales mediante el agua de bebida y el alimento contaminado.

## V. CONCLUSIONES

1. Se determinó una seroprevalencia de 41% a Neospora spp. en los vacunos estudiados del sector de Cayma La Tomilla.
2. Existe diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre las frecuencias observadas y esperadas para el diagnóstico de seroprevalencia de Neospora caninum según la edad del vacuno.
3. Existe diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre las frecuencias observadas y esperadas para el diagnóstico de seroprevalencia de Neospora caninum según el número de lactancia como indicador de categoría productiva. Asimismo existe asociación estadística ( $p < 0.05$ ) entre muestras serológicas según número de lactancia o categoría productiva.
4. El presente trabajo confirma la presencia de una elevada seroprevalencia de anticuerpos a Neospora caninum en el área de estudio y ha logrado detectar algunos posibles factores de riesgo potenciales asociados a la seroprevalencia, que incluyen la presencia de perros vagabundos y palomas en los predios, el alimento contaminado, la contaminación del agua de bebida, el tipo de clima característico de la zona, que pueden ser responsables de infecciones adquiridas por los animales.
5. Los resultados de los análisis parasitológicos de las muestras de heces de los caninos presentes en 2 de los hatos en estudio fueron negativos a la presencia de Neospora caninum.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Difundir los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación a los criadores de la zona, para concientizarlos y de esta forma tomen medidas de control que permitan disminuir la difusión de la enfermedad.
2. Capacitar al personal que labora en los fundos sobre la infestación de Neospora caninum y su influencia en el sistema de producción la cual perjudica al hato sanitariamente, reproductivamente y por ende económicamente.
3. Seguir monitoreando la seroprevalencia de Neospora caninum tanto en bovinos como en caninos en los hatos de la zona.
4. Impedir el acceso de los perros vagabundos a las fuentes de agua, pasturas y silos donde se almacene alimento para los bovinos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, M. L., Blanchard, P. C, Barr, B. C., Dubey, J. P., Hoffinan, R.L., Conrad, P. A. (1991). Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in carifornia dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 198.241-244
2. Andresen, H. 1999. Neosporosis en el Perú y el mundo. Rev. Cienc. Vet. 15: 30-31.
3. Atkinson, R., Harper, P. A., Reichel M. P., y J.T. Ellizs. (2000b).Progress in the serodiagnosis of Neospora caninum infections of cattle. Parasitol. Today 16, 110-114.
4. Atocsa, J. (2005), Seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros criados al pastoreo en la provincia de Melgar, Puno. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Fac. Medicina veterinaria. Universidad Mayor de San Marcos. Lima – Perú.
5. Aycaci, r.2005.Parasitología- Neospora caninum,disponible en: [www.Monografias.com/trabajos30/neospora-caninum/neospora-caninum](http://www.Monografias.com/trabajos30/neospora-caninum/neospora-caninum)
6. Barr, B. C., Anderson, M- L., Dubey, J. P. y ¶ hacha, P. A. (1991).Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet. Pathol. 28, 110-116.
7. Barr, B. C., Rowe, J. D., SverLow, K. w., BonDurant, R. H., Ardans, A. A., Oliver, M. N. y Conrad, P. A. (1994b). Experimental reproduction of bovine fetal Neospora infection and death with a bovine Neospora isolate. J.vet.Diagn.Invest 6, 207-215.
8. Barriga, o. 2002. Las Enfermedades Parasitarias de los Animales Domésticos. Primera Edición. Editorial Germinar. Santiago de chile. Página 193.
9. Bjerkas. I., y Dubey, J. P. (1991). Evidence that Neospora caninum is identical to the Toxoplasma-like parasite of Norwegian dogs. Acta vet. Scand. 32, 407-410.

10. Bjekas, I.; S-F. Mohn; y J. Presthus. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd* 70:271-274.
11. Björkman, C., y Uggla, A. (1999). Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int. J.Parasitol.* 29, 1497 – 1507
12. Botero, D.; M. Restrepo. 1gg2. Toxoplasmosis. En: *Parasitosis Humana*- Botero D., M. Restrepo (Ed). 2da ed. P.3l-4S. Corporación Peruano Investigaciones Biológicas. Medellín-Colombia.
13. Cabrera, M.; P. Ortiz-, J. Claxton; D. willians y A. Trees. (2000). Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en el ganado vacuno del Perú Resúmenes IV Congreso Peruano de Parasitología. Lima. P 212.
14. Campero C., 2002, Pérdidas provocadas por *Neospora caninum* en bovinos, Disertación de la Reunión de Especialistas en Parasitología Veterinaria de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay- 11º Encuentro de Veterinarios Endoparasitológicos Rioplatenses, Facultad de Ciencias Veterinarias, Tandil. Universidad Nacional del Centro.
15. Cepanzo/ops/oms. 2000. Nota Técnica N° 18. Procedimientos para Estudios de Prevalencia de Muestreos.
16. Chávez. a., p. silva h. rivera et al. 2002. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos lecheros del valle de Lima. *Rev. Investig. Vet. Perú*, vol 13, no.2, p.51-55. ISSN 1609-91 17.
17. Collantes-Fernandez,E., Zeballos, A., Alvarez-Garcia, G., y Ortega-Mora, L. M.(2002). Quantitative detection of *Neospora caninum* in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR. *J.Clin. Microbioj.* 40,1194-1198.
18. Conrad, P. A., Barr, B. C., Sverlow, K. W., Anderson M., Daft, B., Kinde, H., Dubey, J. P., Munson, L., y A. Ardans. (1993a). In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. From aborted bovine ♀ hachap. *Parasitology* 106, 239-249.

19. Cordero del campanillo, M. et al. 2002. Parasitología Veterinaria Tercera edición. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana. Madrid – España. Páginas 330-332, 668-669.
20. Cordero del campillo, M.; F. Rojo, A. Martinez, M. Sánchez-, S. Hernández-, I. Navarrete; P. Diez-. H. Quiroz-, y M. Carvalho. (1999). Parasitología Veterinaria. P.665-672. Ed. Mc Graw-Hill. España.
21. Cornejo n.; a. chávez v.; e. casas y c. arana et al. 2004, Seroprevalencia de Neospora caninum en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del Valle del Mantaro. Rev. Per. hachapoy. Vet. Perú. Vol.15. N°.1. p.70-75. ISSN 1609-9117.
22. Daniel, W. 1996- Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 5ta. Ed. P.205 -207, 453 -462. F;d, Limusa. México.
23. De Irala, J.-, R. Fernandez-Crehuet, y A. Serrano del Castillo. (1997). Intervalos de confianza anormalmente amplios en regresión logística: interpretación de resultados de programas estadísticos. Rev Panam Salud Publica/Pan Am J public Health 1(3) 230-234
24. Del Campo, J. (2003). Frecuencia de Neospora caninum en perros de establos lecheros del valle de lima. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Fac. Medicina Veterinaria. UNMSM. Lima – Perú.
25. Dubey, J. P. (1999a). Neosporosis in cattle: biology and economic impact. J.Am.Vet, Med.Assoc. 214, 1160-1163.
26. Dubey, J. P. (1999b). Neosporosis-the first decade of research. Int.J.Parasitol. 29,1485-1488.
27. Dubey, J.P., Barr, B. c., Barta J. R., Bjerkas, I., E3jörkman, BL., Blagburn, B. L., Bowman, D. D., Buxton, D., Ellis, J. T., Gottseiq B., Hemphill, A., Hill, D. E., Howe, D. K., Jenkins, M. c., Kobayashi, y., Koudela, 8., Marslr, A. E., Mattsson, J. G., McAllister, M. M., Modry, D., Omatly., Sibley, L. D., Speer, C. A., Traes, A.J., uggla, A., upton, s. J., hachapo, D. J., y Lindsay, D. s. (2002a). Redescription of Neospora caninum and its differentiation from hachapo hachapo. Int.J.Parasitol. 32, 929-946.

28. Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J., y A. Uggla. (19gSa). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J.Am.Vet.Med.Assoc. 192, 1269- 1285.
29. Dubey, J. P., Romand, s., Hilali, M., Kwok o. C., y P. Thulliez. (1998b). Seroprevalence of antibodies to Neospora caninum and Toxoplasma gondii in water buffaloes (Bubalus bubalis) from Egypt. Int.J.parasitol. 28, 527-529.
30. Echaide I. 2000. Jornada sobre enfermedades emergentes del bovino: Neosporosis Bovina. FAV LINRC. Río Cuarto – República Argentina
31. Echaide I., B. VALENTIM. 2000. Sanidad: La Neosporosis en hatos lecheros. Chacra N° 832. Pág. 130.
32. Fort, M, 2003. Neospora caninum: Estudio seroepidemiológico en bovinos de la provincia de La Pampa. Editorial EEA Anguil. La Plata – Argentina. Pág.1-43.
33. Fredes, Neosporosis. LAB. De Inmunoparasitología. Facultad de Ciencias Veterinaria y Pecuarias. Universidad de Chile.
34. Guía de trabajos prácticos cursos de inmunológica básica: <http://www.vet.unicedu.ar/hachapo/Inmunologia/2ª06/GuiaIntro06.pdf>
35. Google earth 6.2
36. Jenkins, M.C., Bazler, T., Björkman, C., Schares, G., y D Willians. (2002). Diagnosis and seroepidemiology of Neospora caninum associated bovine abortion. Int.J. Parasitol. 32,631-636.
37. Holmdahl Mattsson, J. G. (19%). Rapid and simple identification of Neospora caninum (Apicomplexa: Sporozoa) transcribed spacer by in vitro amplification of the spacer 1. Parasitology 112 (Pt 2), 177-182.
38. Horna, s.a. chavez, h. rivera, e. casas y e. serrano et al. 2003. Seroprevalencia de Neospora caninum en caninos en dos distritos de la provincia de Chachapoyas.. Rev. Investig. Vet. Perú.

39. INEI: III censo Nacional agropecuario 1994 (CENAGRO) disponible en: [www.inei.gob.pe /BancoCuadros/bancocuadro](http://www.inei.gob.pe/BancoCuadros/bancocuadro).
40. Jekins, M.C., y J.P Dubey,. (1996<sup>a</sup>) Development of a polymerase chain reactions assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 genes.
41. Lally, NC.Jekins, M.C., Jekins, M.C., y J. P Dubey, (1996a). Development of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of neosporosis using the *Neospora caninum* 14-3-3 gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* 75, 169-178.
42. Lindsay, D.S. y Dubey, J.P. (1989b). Immunohistochemical diagnosis of *Neopora Caninum* in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50, 1981-1983.
43. Lindsay, D. S. y Dubey J. P. (1990a). Effects of zulfadiazine Neosoono *caninum* and amprolium on (protozoa:Apicomplexa) infection in mice *J.parasitol.* 76, 177-179.
44. Lindsay D.s.y Dubey, J. P. (1990a). Effects of. Sulfadiazine and amprolium on *Neospora, caninum* and amprolium on (protozoa:Apicomplexa) infections in mice. *J.parasitol.* 76, 177-179
45. Lindsay, D. S., Speer, C. A., Toivio\_Kinnucarl M. A., Dubej J. p., y Blagburn, B. L (1993). Use of infected cultured cells to compare
46. Lindsay' D.S. , Upton, s. J. y Dubey J. P. (1999c). A structural study of the *Neospora caninum* oocyst. *Int. J.parasitol.* 29, 1521- 1523 .
47. Marsh' A. E. BARR, B, 6,, Madigan J., Lakri tz J. ,Nordhausen, R., y P hacha, P. A. (1996), Neosporosis as a cause of P hacha protozoal myeroencepharitis. *J.Am. Vet.Med.Asso c.* 209
48. Marsh. A. E., Buo, B. c., packham A. E., y conrad, p. A. (1998). Description of a new *Neospora* species (protozoa: Apicomplexa)
49. Mc Allister., M. M., Dubey, J. P., D.S., Jolley, W. R., Wills, R. A., y McGuire, A. M. (1998). Dogs are definitive hosts of *Neospora, caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28, 1473-1478.



50. Merk & CO. 2000. El Manual Merck de veterinaria. Quinta Edición. Editorial Océano. Barcelona \_ España. Página 39.
51. MINAG, 2001, gerencia regional de agricultura, información agraria.
52. Moore. D. 2006. Reunión de La Academia de Agronomía y veterinaria Actualización en Neosporosis Bovina Balcarce \_ Argentina.
53. Moore, D. el al. 2000. Sugerencias INTA Patología Veterinaria. Boletín Provincia de Buenos Aires – Argentina. Y para limpiar la Neosporosis Bovina. Veterinario 16. Colegio de Veterinario de la Páginas 43 – 45.Congreso de Veterinarias.
54. Moore, D., A. Odeón, c. Campero. 2006. Neosporosis bovina: una actualización- Rev. Vet. Arg. Vol. xvIII N° 100. Páginas 752-775.
55. Moya R. Tiempos Pre-Hispánicos: característicos demográficas de Huancabamba.
56. Müller, N., vonlaufen, N., Gianinazzi, c., Leib, s. L. y Hemphill, A. (zoaz). Application of real-time fluorescent PCR. For quantitative assessment of Neospora, caninum infections in organotypic slice culturas of rat central nervous system tissue. J.Clin. Microbioj . 40,252-;55.
57. Ortiz” P. y M. Cabera. 2003. Conferencia presentada en el Producción Lechera: PERÚ LACTEA 2003. Facultad de ciencias Universidad Nacional de Cajamarca.
58. Quevedo, J.(2003). Neosporosis en de Chachapoyas. Tesis para optar Veterinaria. I/NMSM. Lima \_ Perú. Bovinos lecheros en dos distritos de la provincia ael título de Médico Veterinario. Fac. Medicina
59. Quevedo, J., A Chávez. H. RMRA er al. 2003. Lecheros en dos distritos de la provincia de ¨ hachapoyas. Vol.14
60. Rivera O., D.; Rojas O., H.; Urcelay V., S.; Hamilton-West M., C. Sanidad animal y comercio internacional Avances en Ciencias Veterinarias, Norteamérica, 2722 08 2012. Consultado el may 5 , 2012, de

<http://www.avancesveterinaria.uchile.cl/index.php/ACV/article/viewArticle/21998/23318>

61. SENAMHI (2011). Sistema nacional de meteorología e hidrología del Perú.



## ANEXO N° 1

### FOTOGRAFÍAS

#### FOTO N° 1: HERDCHEK: ANTI-NEOSPORA



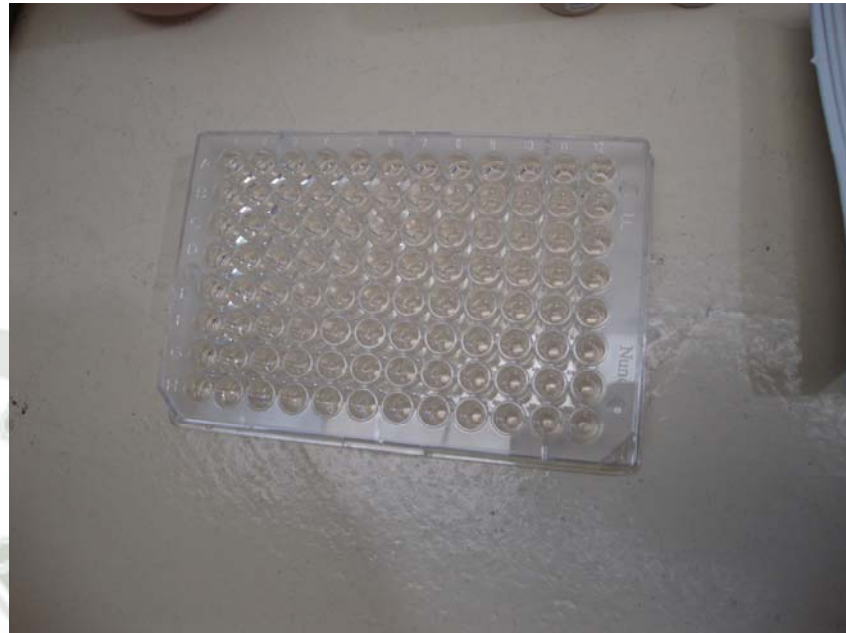
Fuente: Propia

#### FOTO N°2: REACTIVOS DEL KIT



Fuente: Propia

FOTO N°3: PLACAS RECUBIERTAS CON ANTÍGENO DE NEOSPORA.



Fuente: Propia

FOTO N° 4: PUNTAS DE PIPETAS DESECHABLES



Fuente: Propia

**FOTO N° 5: SUEROS DE BOVINOS**



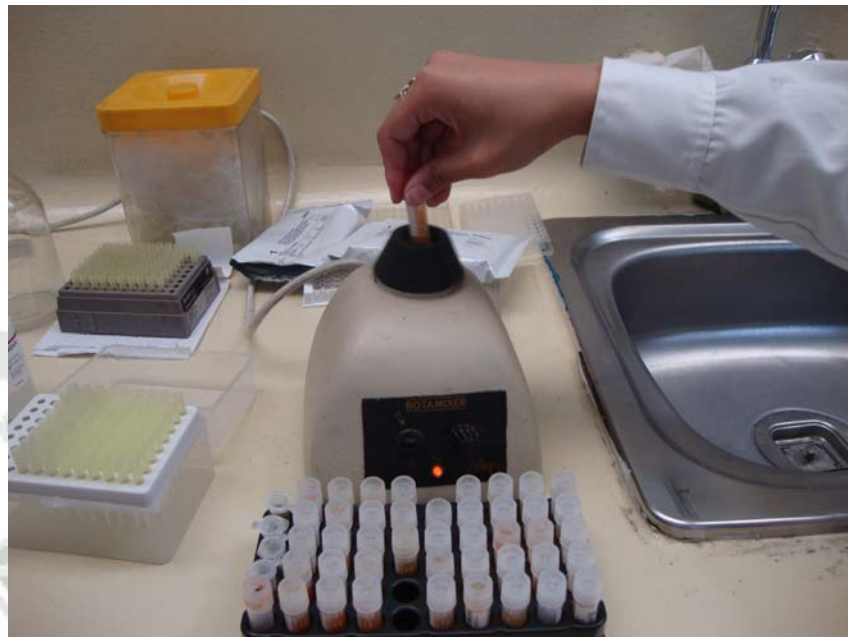
Fuente: Propia

**FOTON°6: SUEROS DE BOVINO**



Fuente: Propia

**FOTO N° 7: MEZCLADOR**



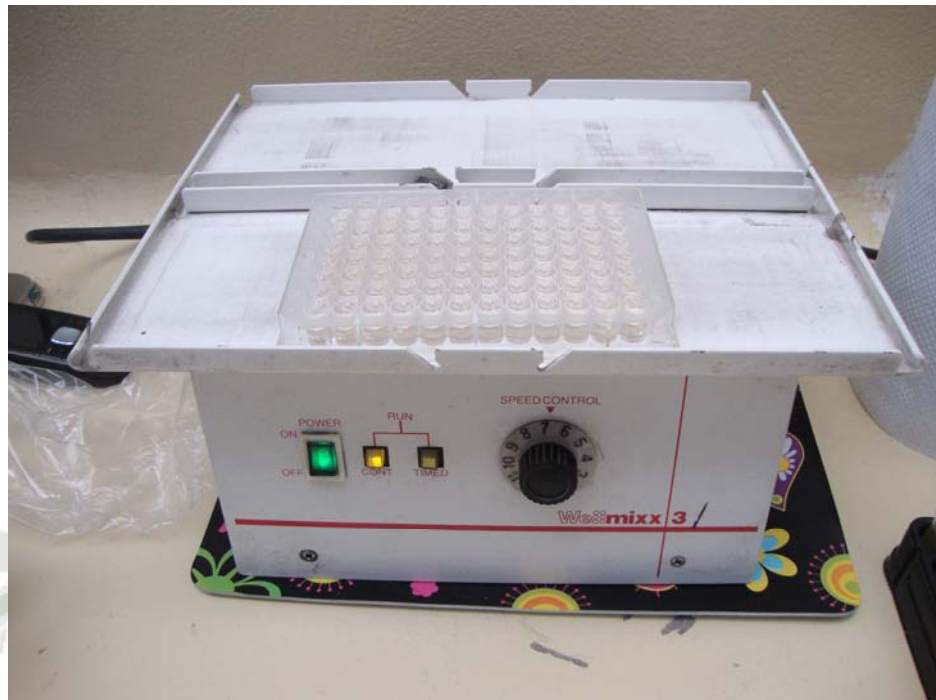
Fuente: Propia

**FOTO N° 8: MEZCLADOR DE MUESTRAS**



Fuente: Propia

FOTO N° 9: AGITADOR



Fuente: Propia

FOTO N° 10: COLOCACIÓN DE LAS MUESTRAS EN LOS POZOS



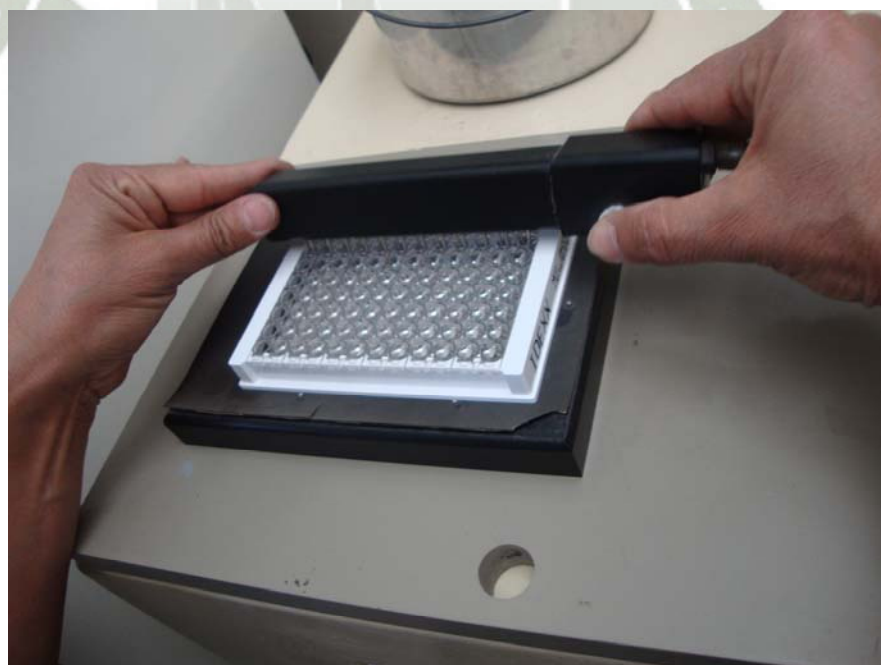
Fuente: Propia

**FOTO N° 11: INCUBACIÓN DE LAS MUESTRAS**



Fuente: Propia

**FOTO N° 12: LAVADO DE LOS POZOS**



Fuente: Propia



FOTO N° 13: CONJUGADO ANTIBOVINO



Fuente: Propia

FOTO N° 14: COLOCACIÓN DEL CONJUGADO ANTI BOVINO EN LOS  
POZOS



Fuente: Propia

FOTO N° 15: INCUBACIÓN



Fuente: Propia

FOTO N° 16: LAVADO DE LOS POZOS



Fuente: Propia

FOTO N° 17: SOLUCIÓN SUBSTRATO



Fuente: Propia

FOTO N° 18: SOLUCIÓN DE INTERRUPCIÓN



Fuente: Propia

FOTO N° 19: ESPECTROFOTÓMETRO



Fuente: Propia

FOTO N° 20: LECTURA DEL ESPECTROFOTÓMETRO



Fuente: Propia

FOTO N° 21: RESULTADOS



Fuente: Propia

FOTO N° 22: ABSORVANCIA DE LAS MUESTRAS



	1	2	3	4	5	6
A	0.090	0.352	0.096	0.058	0.061	0.055
B	0.846	1.238	0.126	0.076	0.057	0.055
C	0.284	0.966	1.106	0.063	0.054	0.056
D	1.296	0.145	1.310	0.052	0.053	0.054
E	1.067	0.129	0.536	0.057	0.054	0.055
F	0.171	0.896	0.091	0.056	0.059	0.053
G	0.756	0.103	0.058	0.063	0.061	0.057
H	0.112	0.102	0.060	0.087	0.076	0.069

Fuente: Propia

## ANEXO N° 2

### MAPA DE UBICACIÓN DE LA ZONA DE CAYMA LA TOMILLA



Fuente: Google earth 6.2



ANEXO N° 3

HOJA DE ENCUESTA

1.1 Encuestas

HOJA DE ENCUESTA

NOMBRE DEL PROPIETARIO: \_\_\_\_\_

SECTOR: \_\_\_\_\_

N° DE ANIMALES: \_\_\_\_\_

1. ¿Cuántos abortos mensuales registra en su establo?

---

2. ¿Cómo identifica al feto?

Macerado ( )

Momificado ( )

Malformaciones congénitas ( )

3. ¿Vacuna a su ganado?

Si ( ) No ( )

En qué temporada:

Cuántas veces al año:

Vacuna a todo el ganado: Si ( ) No ( ) especifique cuáles:

4. ¿Quién acostumbra vacunar su ganado?

SENASA ( )

Su médico veterinario ( )

Algún laboratorio ( )

5. ¿Cuántos perros tiene en su establo?

---



Fuente: Propia



**ANEXO N° 4**

**HOJA DE TRABAJO PARA LA PRUEBA DE ELISA DIRECTA EN  
Neospora caninum**

Registro de ingreso: \_\_\_\_\_ Antígeno Lote: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_ Operador: \_\_\_\_\_ Especie: \_\_\_\_\_

Placa N°: 1


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1
1	+	+	-	-	1	2	3	4	5	6	7	8
2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3
4	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4
5	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5
6	5	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6
7	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8
8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9	9	9

Placa N°: 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	+	+	-	-	1	2	3	4	5	6	7	8
2	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
3	2	2										

**Fuente: Propia**

ANEXO N° 5



**LABVETSUR**  
Laboratorio Veterinario del Sur

<b>ENVIADO POR:</b> Srta. Andrea Rivera	<b>FECHA DE INFORME:</b> 18/09/2012
	<b>Nro. DE DIAG:</b> 602.
	<b>REFERENCIA:</b> B21/9 - 12
<b>DIRECCION:</b>	<b>FECHA DE ENVIO:</b> 18/09/2012
	<b>FECHA DE RECIBIDO:</b> 18/09/2012

**REPORTE DE EXAMENES**

<b>PROPIETARIO:</b> Srta. Andrea Rivera	<b>ANIMAL Nro.</b>
<b>DIRECCION:</b> Cayma	<b>ESPECIE:</b> Bovinos
	<b>RAZA:</b> Holstein
<b>PROVINCIA:</b> Arequipa	<b>SEXO:</b>
<b>DPTO:</b> Arequipa	<b>EDAD:</b>

**HISTORIA**

**PRUEBAS REALIZADAS:**

Laboratorio	Muestras	Total	Prueba
Inmunología	Sueros	114	Neospora

**RESULTADOS**

N°	IDENTIF.:	Código:	Neospora:
1	Pilar	x	S.R. "Negativo"
2	Asunta	x	S.R. "Negativo"
3	Linda	2	S.R. "Negativo"
4	Blanca	1	S.R. "Negativo"
5	Sandra	1	S.R. "Positivo"
6	Brenda	1	S.R. "Positivo"
7	Nicole	1	S.R. "Positivo"
8	Rosa	1	S.R. "Positivo"
9	Roxana	1	S.R. "Positivo"
10	Paloma	2	S.R. "Negativo"
11	Gavina	1	S.R. "Negativo"
12	Lucía	1	S.R. "Negativo"
13	Hilda	1	S.R. "Negativo"
14	Alicia	2	S.R. "Positivo"
15	Maite	2	S.R. "Negativo"
16	Laura	1	S.R. "Negativo"
17	Karen	1	S.R. "Negativo"
18	Mantequilla	2	S.R. "Negativo"
19	Margarita	1	S.R. "Negativo"
20	Blanca	2	S.R. "Positivo"

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A  
Teléfonos: 054-213677 - 232175  
e-mail: labvetsur@hotmail.com  
Arequipa - Perú



21	Cachuda	2	S.R. "Positivo"
22	Selina	3	S.R. "Positivo"
23	Malú	3	S.R. "Positivo"
24	Mili	3	S.R. "Positivo"
25	Lucy	3	S.R. "Positivo"
26	Rocio	3	S.R. "Negativo"
27	Lupe	3	S.R. "Negativo"
28	Margot	3	S.R. "Positivo"
29	Sarha	3	S.R. "Negativo"
30	Nora	3	S.R. "Negativo"
31	Libia	3	S.R. "Positivo"
32	Azucena	3	S.R. "Negativo"
33	Cris	3	S.R. "Negativo"
34	Elsa	3	S.R. "Negativo"
35	Flor	3	S.R. "Positivo"
36	Mery	3	S.R. "Negativo"
37	Paloma	3	S.R. "Positivo"
38	Lia	3	S.R. "Negativo"
39	Gata	3	S.R. "Negativo"
40	Ester	3	S.R. "Negativo"
41	Lita	3	S.R. "Negativo"
42	Maju	3	S.R. "Negativo"
43	Dany	3	S.R. "Negativo"
44	Mavila	3	S.R. "Negativo"
45	Lulu	3	S.R. "Negativo"
46	Liza	3	S.R. "Positivo"
47	Dinar	3	S.R. "Positivo"
48	Naty	3	S.R. "Positivo"
49	Rafa	3	S.R. "Positivo"
50	Reyna	3	S.R. "Negativo"
51	Luna 105	3	S.R. "Negativo"
52	Cora	3	S.R. "Positivo"
53	Malena	3	S.R. "Negativo"
54	Wali	3	S.R. "Negativo"
55	Eva	6 J.R.	S.R. "Positivo"
56	Mota	x	S.R. "Negativo"
57	Longeva	6512	S.R. "Positivo"
58	Anahi	3	S.R. "Negativo"
59	Andrea	3	S.R. "Positivo"
60	Micaela	3	S.R. "Negativo"

... es calidad

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A  
Teléfonos: 054-213677 - 232175  
e-mail: labvetsur@hotmail.com  
Arequipa - Perú



61	Clara	3	S.R. "Positivo"
62	Jatzel	3	S.R. "Positivo"
63	Carmen	3	S.R. "Positivo"
64	Vilma	3	S.R. "Positivo"
65	Lali	3	S.R. "Negativo"
66	Marta	3	S.R. "Positivo"
67	Karina	3	S.R. "Negativo"
68	Tula	3	S.R. "Positivo"
69	Ana	3	S.R. "Negativo"
70	Diana	3	S.R. "Positivo"
71	Bety	3	S.R. "Negativo"
72	Negra	3	S.R. "Negativo"
73	Liz	Salomé	S.R. "Positivo"
74	Catita	Salomé	S.R. "Negativo"
75	Gringa 2	Salomé	S.R. "Negativo"
76	Colorada	Salomé	S.R. "Negativo"
77	Manchada	Salomé	S.R. "Negativo"
78	Angela	Salomé	S.R. "Negativo"
79	Nena	Salomé	S.R. "Positivo"
80	Liza	Salomé	S.R. "Positivo"
81	Rita	Salomé	S.R. "Positivo"
82	Luz	Salomé	S.R. "Negativo"
83	Cachito	Salomé	S.R. "Negativo"
84	Pequeña	Salomé	S.R. "Negativo"
85	Negra	Salomé	S.R. "Negativo"
86	Gringa	Salomé	S.R. "Negativo"
87	Tila	Salomé	S.R. "Negativo"
88	Donata	Jacinto	S.R. "Negativo"
89	Petiza II	x	S.R. "Positivo"
90	Rosa	Jacinto	S.R. "Positivo"
91	Barbara	Jacinto	S.R. "Negativo"
92	Carola	Jacinto	S.R. "Negativo"
93	Sosa	Jacinto	S.R. "Positivo"
94	Pinta	Jacinto	S.R. "Negativo"
95	Milagros	Jacinto	S.R. "Negativo"
96	Rubi	Jacinto	S.R. "Positivo"
97	Fali	Jacinto	S.R. "Positivo"
98	Ñuta	Jacinto	S.R. "Negativo"
99	Lucha	Jacinto	S.R. "Positivo"
100	Naty	Jacinto	S.R. "Negativo"

... es calidad

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A  
Teléfonos: 054-213677 - 232175  
e-mail: labvetsur@hotmail.com  
Arequipa - Perú



101	Coneja	Jacinto	S.R. "Negativo"
102	Angelita	Jacinto	S.R. "Positivo"
103	Rata	Jacinto	S.R. "Positivo"
104	Petiza	Jacinto	S.R. "Negativo"
105	Frio	Jacinto	S.R. "Negativo"
106	Blanca	Jacinto	S.R. "Positivo"
107	Darlene	6 J.R.	S.R. "Negativo"
108	Nina	6 J.R.	S.R. "Negativo"
109	Victoria	6 J.R.	S.R. "Negativo"
110	Carmin	6 J.R.	S.R. "Negativo"
111	Julia	x	S.R. "Positivo"
112	Careli	x	S.R. "Positivo"
113	Valeriana	x	S.R. "Positivo"
114	Carla	x	S.R. "Negativo"

S.R. : Sero - reactor

**Material y método empleado:**

ELISA indirecta. Detección de anticuerpos. KIT IDEXX - USA.



*[Handwritten Signature]*  
 MVZ. Mg. VARGAS MANRIQUE  
 CMVP - 803  
 GERENTE

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A  
 Teléfonos: 054-213677 - 232175

*... es calidad*

ANEXO N° 6



**RESULTADOS DE PARASITOLOGIA:**

MUESTRA: Heces de perro  
 FECHA DE ENVIO: 28 de setiembre del 2012  
 ESPECIE: Perro  
 DUEÑO: VARIOS  
 ENVIADO POR: ANDREA RIVERA PASTOR - TESIS

**RESULTADOS:**

Se realizaron los análisis parasitológicos de las muestras heces enviadas con el Método de flotación de Mac Master modificado, con solución salina sobresaturada.

NOMBRE DEL PERRO	SEXO	EDAD	ESTABLO	RESULTADO
Burgués	Macho	2 años		Negativo
Negro	Macho	1 año		Negativo
Proletarios	Macho	3 años		Negativo
Osos	Macho	2 años		Negativo
Wesla	Hembra	1 año		Negativo

Atentamente

Arequipa, 01 de Octubre I del 2012



M. Sc. M.V. Fernando A. Fernández F.  
C.M.V.P. 2462

ANEXO N°7

TABLA DE CONTINGENCIA DE CHI CUADRADO

StatMost for Windows Friday, October 12, 2012 9:02:28 AM

\*\*\*\*\* Chi-Square Test Analysis Results \*\*\*\*\*

Positivos vs. Negativos:

Column Name	Count	N+	NO	N-
Positivos	3	2	0	0
Negativos	3	2	0	0

Binned Data:

i.e. R is observed and S is expected:  $(R-S)/(R+S)$

Minimum Size = 2

Degree of Freedom = 1

Chi-Square = 3.508772

Probability = 0.061045

Non-Binned Data:

i.e. X is observed and Y is expected:  $(X-Y)/Y$

Degree of Freedom = 1

Chi-Square = 5.970149

Probability = 0.014550

\*\*\*\*\*The End\*\*\*\*\*

ANEXO N°8

TABLA DE CONTINGENCIA DE CHI CUADRADO SEGÚN ESTABLOS

StatMost for Windows Friday, October 12, 2012 7:59:12 AM

Contingency Table (Chi-Square) Results

Count	Expect	Res	Chi Sqr	ROW	Posi ti vos	Negati vos	TOTAL
1	8.0000	7.8333	0.1667	1	8.0000	11.0000	19.0000
		0.0035	0.0025				16.67%
							0.0060
2	26.0000	25.1491	0.8509	2	26.0000	35.0000	61.0000
		0.0288	0.0202				53.51%
							0.0490
3	4.0000	6.1842	-2.1842	3	4.0000	11.0000	15.0000
		0.7714	0.5412				13.16%
							1.3126
4	9.0000	7.8333	1.1667	4	9.0000	10.0000	19.0000
		0.1738	0.1219				16.67%
							0.2956
TOTAL	47.0000	41.23%	58.77%		47.0000	67.0000	114.0000
							100.00%

Chi-Square = 1.663273  
Degree of Freedom = 3  
Probability = 0.645130

\*\*\*\*\* The End \*\*\*\*\*



ANEXO N°9

TABLA DE CONTIGENCIA DE CHI CUADRADO SEGÚN EDAD

StatMost for Windows Friday, October 12, 2012 8:08:46 AM

Contingency Table (Chi-Square) Results

Count Expect Res Chi Sqr ROW	Posi ti vo	Negati vo	TOTAL
1	10.0000 14.4298 -4.4298 1.3599	25.0000 20.5702 4.4298 0.9540	35.0000 30.70%  2.3139
2	23.0000 18.1404 4.8596 1.3019	21.0000 25.8596 -4.8596 0.9132	44.0000 38.60%  2.2151
3	14.0000 14.4298 -0.4298 0.0128	21.0000 20.5702 0.4298 0.0090	35.0000 30.70%  0.0218
TOTAL	47.0000 41.23%	67.0000 58.77%	114.0000 100.00%

Chi-Square = 4.550776  
Degree of Freedom = 2  
Probabi l i ty = 0.102757

\*\*\*\*\* The End \*\*\*\*\*

ANEXO N° 10

TABLA DE CONTINGENCIA DE CHI CUADRADO SEGUN CATEGORÍA  
REPRODUCTIVA

StatMost for Windows Friday, October 12, 2012 8:24:50 AM

Contingency Table (Chi-Square) Results

Count	Expect	Res	Chi Sqr
ROW	Posi ti vo	Negati vo	TOTAL
1	11.0000	25.0000	36.0000
	14.8421	21.1579	31.58%
	-3.8421	3.8421	
	0.9946	0.6977	1.6923
2	15.0000	13.0000	28.0000
	11.5439	16.4561	24.56%
	3.4561	-3.4561	
	1.0347	0.7259	1.7606
3	8.0000	10.0000	18.0000
	7.4211	10.5789	15.79%
	0.5789	-0.5789	
	0.0452	0.0317	0.0768
4	6.0000	6.0000	12.0000
	4.9474	7.0526	10.53%
	1.0526	-1.0526	
	0.2240	0.1571	0.3811
5	7.0000	13.0000	20.0000
	8.2456	11.7544	17.54%
	-1.2456	1.2456	
	0.1882	0.1320	0.3202
TOTAL	47.0000	67.0000	114.0000
	41.23%	58.77%	100.00%

Chi-Square = 4.230976  
Degree of Freedom = 4  
Probability = 0.375648

\*\*\*\*\* The End \*\*\*\*\*