



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA



**“SEROPREVALENCIA DE *Neospora caninum* EN VACUNOS DEL
CENTRO EXPERIMENTAL CHUQUIBAMBILLA”**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. MIRIAM YANNENA DUEÑAS CESPEDES

**PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

PUNO – PERÚ

2021



DEDICATORIA

Agradecer a mis Padres, hermanas por su apoyo incondicional, y constante motivación que hizo posible este logro personal.

A mi Esposo Luis Aguirre y mis hijos Marcelo y Dayron, lo más valioso que Dios me dio

Miriam Y, Dueñas C



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero a Dios que me dio el don para alcanzar una de mis metas.

A la Universidad por abrirme las puertas para ser una mejor persona y buena profesional.

A mi Catedrático, Doctor Natalio Luque Mamani por confiar en mí, a mis asesoras, la Dra Dianett Benito y la Dra Violeta Pilco.

Miriam Y, Dueñas C



INDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS

INDICE DE ACRONIMOS

RESUMEN 8

ABSTRACT..... 9

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1. OBJETIVO GENERAL 12

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 12

CAPITULO II

REVISION DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN 13

2.1.1. A nivel Internacional 13

2.1.2. A nivel Nacional..... 15

2.1.3. A nivel local 16

2.2. MARCO TEORICO..... 17

2.2.1. Neospora Caninum 17

2.2.2. Taxonomía..... 18

2.2.3. Ciclo Biológico..... 18

2.2.4. Estructura del Neospora Caninum..... 19

2.2.5. Agente Etiológico 19

2.2.6. Epidemiología..... 21



2.2.7. Factor de Riesgo	23
2.2.8. Tipos De Transmisión	28
2.2.9. Patogénesis	28
2.2.10. Diagnostico.....	29
2.2.10.1. Técnicas serológicas empleadas	29
2.2.11. Signos Clinicos	33

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. ZONA DE ESTUDIO	34
3.2. POBLACION - MUESTRA.....	34
3.3. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS:.....	35
3.4. METODOLOGÍA.....	37
3.5. ANALISIS ESTADISTICO	40

CAPITULO VI

RESULTADOS Y DISCUSION

V. CONCLUSIONES	49
VI. RECOMENDACIONES	50
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	51
ANEXOS.....	58

Área: Salud Animal.

Tema: Seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos.

FECHA DE SUSTENTACION: 12 de febrero del 2021



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Número de vacunos distribuidas según edad y raza del Centro Experimental Chuquibambilla para determinar la Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> 35	
Tabla 2.	Seroprevalencia general de <i>Neospora caninum</i> en vacunos del centro Experimental Chuquibambilla	41
Tabla 3.	Seroprevalencia de <i>N. caninum</i> en vacunos según edad, del Centro Experimental Chuquibambilla.	44
Tabla 4.	Seroprevalencia de <i>N. caninum</i> en vacunos según raza del Centro Experimental Chuquibambilla	46



ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

FMVZ = Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

C/P = Con producción

S/P = Sin Producción

ELISA = Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

IFI = Inmunofluorescencia indirecta

UNA = Universidad Nacional del Altiplano

T.M. = Toneladas métricas

RIA = Radio inmunoensayo

Rpm = Revoluciones por minuto

Nm = Nanómetros

Ig G = Inmunoglobulinas G

Ig M = Inmunoglobulinas M

IL = Interleucina

μL = Microlitros

mL = Mililitros

ADN = Ácido desoxirribonucleico



RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Centro Experimental Chuquibambilla de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano Puno, con el objetivo de determinar la Seroprevalencia del *Neospora caninum*, en 88 vacunos hembras seleccionados por el método estadístico de muestro al azar, provenientes de 4 razas (Brown Swiss, Aberdeen Angus, Charoláis y Criollo) y 2 edades (mayores de 2 años y menores de 2 años). El método de diagnóstico fue la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), con la cual, se detectó anticuerpos contra el patógeno; realizada en el Laboratorio de Salud animal, para lo cual se tomó muestras de 5 mL de sangre a nivel del tercio inferior del cuello de la vena yugular de los animales, obtenidos durante el año 2019. Luego de los análisis, se determinó que la Seroprevalencia en general del *Neospora caninum* en el centro experimental fue de 4.55 %; según edad para vacunos mayores de 2 años fue de 4.54 %, para vacunos menores de 2 años 4.54 % no encontrando diferencia significativa ($p \geq 0.05$); según raza, se determinó que para vacunos Charoláis fue de 9.09 %, Criollos de 4.54 %, Aberdeen Angus de 4.45 % y Brown Swiss de 0 %, no encontrando diferencia estadística significativa ($p \geq 0.05$). Con lo que se puede concluir que existe la presencia del *Neospora caninum* en el Centro Experimental Chuquibambilla.

Palabras Claves: *Neospora caninum*, ELISA, raza y edad.



ABSTRACT

The present research work was carried out at the Chuquibambilla Experimental Center of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry of the National University of the Altiplano Puno, with the objective of determining the Seroprevalence of *Neospora caninum* in 88 female cattle selected by the statistical method of random sampling, from 4 breeds (Brown Swiss, Aberdeen Angus, Charolais and Criollo) and 2 ages (older than 2 years and younger than 2 years). The diagnostic method was the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique, with which antibodies against the pathogen were detected; performed in the Animal Health Laboratory, for which 5 mL of blood samples were taken at the level of the lower third of the neck of the jugular vein of the animals, obtained during the year 2019. After the analysis, it was determined that the overall Seroprevalence of *Neospora caninum* in the experimental center was 4.55%; according to age for cattle older than 2 years was 4.54%, for cattle younger than 2 years 4.54 % not finding significant difference ($p \geq 0.05$); according to breed, it was determined that for Charolais cattle it was 9.09 %, Criollos 4.54 %, Aberdeen Angus 4.45 % and Brown Swiss 0 %, not finding significant statistical difference ($p \geq 0.05$). Therefore, it can be concluded that *Neospora caninum* is present in the Chuquibambilla Experimental Center.

Key Words: *Neospora caninum*, ELISA, breed and age.



CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La actividad ganadera es de importancia fundamental para el área rural y la seguridad alimentaria del país; ya que genera empleo e ingresos para 1.8 millones de familias, representando un 40.2% del valor bruto de la producción (VBP) del sector agropecuario; se registra la crianza de al menos un bovino en aproximadamente 824 mil productores; existiendo una población de a nivel nacional es de 5'1 01,895 cabezas y a nivel regional de 610,630 vacunos; las principales microcuencas lecheras de la región son: Melgar, Puno, Azángaro, Huancané y San Román con poblaciones de 89,220; 92,900; 107,040; 61,060 y 29,210 vacunos respectivamente (Minagri, 2016).

Existen numerosos agentes infecciosos, causantes de diversos problemas que enfrentan la ganadera bovina, ocasionando altas pérdidas económicas, productivas y reproductivas. Entre los principales agentes patógenos responsables de interrupción de la gestación normal, se tiene a la *N. caninum*, *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* el *Togavirus* que causa la diarrea viral bovina (BVD); hace un par de décadas se perfila al parásito protozoario intracelular *N. caninum* como el causante de grandes problemas reproductivos en varias zonas del mundo, produciendo abortos, reabsorción embrionaria, momificación fetal (Dubey, 2007).

La enfermedad neosporosis, es causada por el mal manejo reproductivo, poca importancia a los calendarios de vacunación, falta de seguimiento clínico durante la gestación bovina; los efectos que ocasiona esta enfermedad reproductiva, durante la



gestación bovina son muy visibles como el aborto que conlleva a la pérdida de una cría, una lactancia, haciendo el crecimiento del hato ganadero muy lento, conllevando a un déficit de ingreso económico e incrementando los costos de producción (Gibney *et al.*, 2008).

Llevar un adecuado manejo sanitario, requiere realizar un diagnóstico temprano, para la prevención de las enfermedades y/o ampliación de programas de sanidad, vacunación, reposición del ganado que aborta y o que muestre alteración de los parámetros productivos, etc., para el caso de la neosporosis son escasos los datos que existen, además que se refieren únicamente a hallazgos esporádicos del agente etiológico o de las lesiones que origina en fetos bovinos que abortaron; haciéndose necesario más estudios epidemiológicos que permitan conocer la prevalencia, los factores de riesgo asociados y la importancia real, tanto económica como sanitaria, de la enfermedad. Por lo que el presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de conocer la Seroprevalencia de *Neospora caninum*, en el centro experimental Chuquibambilla, mediante la utilización de la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y así recabar información sobre esta enfermedad; por lo tanto, los resultados obtenidos servirán para tomar medidas preventivas y de control.



1.1. OBJETIVO GENERAL:

- Determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos del centro experimenta de Chuquibambilla

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar seroprevalencia de *Neospora caninum* según edad.
- Determinar seroprevalencia de *Neospora caninum* según raza.



CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1 A nivel Internacional

Se encontró la importancia de la transmisión horizontal y el rol del perro en la infección con *N. caninum*, por lo que frente a este hecho sería trascendental trabajar en medidas de tenencia responsable de las mascotas con los productores propietarios de perros. Frente a la transmisión vertical la principal medida es mantener un registro de cada vaca, sobre todo frente a eventos de abortos. La tasa de animales seropositivos a la infección por *N. caninum* y su asociación a factores de riesgo en predios de pequeños productores de leche, asociados al programa de Servicio de Asesoría Técnica. Se evaluaron 45 sueros de vacas en período de lactancia de 9 predios y se determinó la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en 18 sueros utilizando la técnica de Enzyme Linked Support-Assay (ELISA). Ubicados en la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, Chile. Los factores de riesgo con asociación estadística fueron: el historial de aborto (OR = 5,09), el tipo de alimentación de los perros del predio (OR = 6), el consumo de agua desde acequias (OR = 4,5) y el manejo del material biológico de partos y abortos (OR = 7,43) Además, se debe considerar la reposición de animales seropositivos a *N. caninum* y que hayan cursado con abortos, siempre complementando estas medidas con mejoras en la bioseguridad de las instalaciones (Lavado, 2015).

Se presentó anticuerpos contra *N. caninum* en vacas con desordenes productivos, se utilizaron para este estudio 196 sueros de vacas procedentes de 27 fincas del municipio de Montería, Colombia, la prueba utilizada para la determinación de anticuerpos fue ELISA, los criterios de inclusión para las vacas fueron: antecedentes de aborto,



momificaciones, reabsorciones embrionarias y repetición de servicios, los resultados del estudio determinó una seropositividad de *N. caninum* del 10,2 %, de los animales muestreados el 10,76 % presenta aborto, 9,75 % fueron vacas repetidoras de celo, 20,0% presentaron momificación fetal y 0,0 % con reabsorciones embrionarias, con los resultados se puede afirmar que existe evidencia de circulación antigénica de *N. caninum* en hembras bovinas del municipio de Montería, Colombia (Oviedo, 2007).

Para las provincias de Santa Fe y Córdoba de Argentina, se establece una Seroprevalencia de 24,4% en fetos abortados, 64,5% en bovinos lecheros y 92,3% para vacunos de carne; para Estados Unidos 10% de prevalencia, Nueva Zelanda 38%, Francia 26%, Suiza 21%, Holanda 17%, Austria 34,1%, para Reino Unido la estimación es 12,5% de abortos, en España se determinaron tasas de prevalencia de 17,9% en fetos bovinos abortados y 83,2% en rebaños lecheros y para México 36,5% (Andersen, 2000).

En un estudio realizado en México, sobre la determinación del *N. caninum* en bovinos. Los resultados arrojados en esta investigación confirman que si existe relación entre caninos y bovinos para que exista el parásito en estas especies. Los resultados obtenidos en este estudio fueron de un 62,14% de relación canino bovinos ante la presencia del parásito. En los bovinos se obtuvo un 61% y en los caninos un 65% de positividad al parásito (Oña, 2015).

Un estudio epidemiológico para determinar la Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a la infección por *Brucella spp.*, *Coxiella burnetii*, *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo y *N. Caninum* en rebaños bovinos de producción láctea y mixta de Ecuador. Un total de 2.668 muestras de suero de 386 rebaños se analizaron mediante kits comerciales de ELISA, La prevalencia real obtenida para *Brucella*, *C. Burnetii*, *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo y *N. caninum* fue de 17,0%, 12,6%, 13,7% y



33,2%, para *N. caninum*, su rango osciló entre el 9 y el 100% (media: 42,3%). la seropositividad de *N. caninum* se identificaron factores de riesgo: una edad superior a 48 meses (Guzmán, 2017).

2.1.2 A nivel Nacional

Se determinó la Seroprevalencia de *N. Caninum* en el valle de Moquegua, distrito de Moquegua provincia de Mariscal Nieto, donde se evaluaron 157 vacas, obteniendo muestras positivas con una Seroprevalencia de 50,96 %. Según la edad en vacas de 2 a 3 años 50,09 % de casos positivos, de 4 a 6 años con 61,40 % resultaron positivos, de 7 a 9 años 37,78 % positivos, más de 10 años 18,18 %. La presencia de perros en los hatos lecheros demuestra así: hatos sin perros 125 % con 1 a 2 perros y más de 5 perros 6,25 dejan a la intemperie de seropositividad (Mamani, 2007).

La frecuencia de *N. Caninum* en vacas lecheras de la cuenca izquierda del Valle del Mantaro, Junín, Perú. Se analizaron 182 sueros de bovinos hembras provenientes de 15 establos lecheros de los distritos de Matahuasi, Concepción, 9 de Julio y Santa Rosa. Se utilizó la prueba de ELISA indirecta con un kit comercial para determinar anticuerpos contra *N. Caninum*. Se encontró una prevalencia de 46.7 ± 7.2 % (85/182). Los distritos de Matahuasi y Santa Rosa presentaron la mayor (68.7%) y menor (17.8%) Seroprevalencia, respectivamente. Los resultados confirman la presencia de una alta frecuencia de *N. Caninum* en bovinos lecheros de la cuenca izquierda del Valle del Mantaro (Granados, 2014).

La Seroprevalencia de *N. caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima en el año 2000. Se evaluaron 304 sueros de vacas lecheras adultas provenientes de 19 establos lecheros ubicados en la zona norte ($n = 12$) y en la zona sur ($n = 7$) del valle de Lima, para detectar anticuerpos contra *N. caninum* mediante la prueba de inmunofluorescencia



indirecta. El $29.6 \pm 5.1\%$ (90/304) de los animales presentó anticuerpos contra el parásito en una dilución de 1:200. La prevalencia en la zona norte fue de $40.8 \pm 8.8\%$ (49/120), mientras que en la zona sur fue de $22.3 \pm 6.0\%$ (41/184). Todos los establos evaluados presentaron algún animal seropositivo a *N. caninum*. Estos resultados confirman la presencia de *N. Caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima (Silva, 2003).

2.1.3 A nivel local

La Seroprevalencia de *N. caninum* en dos centros de crianza de llamas de la provincia de Melgar, Puno. Se evaluaron 275 sueros de llamas hembras en los distritos de Santa Rosa (n = 86) y de Nuñoa (n = 189), mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta. El $16.7 + 4.4 \%$ (46/275) presentó anticuerpos contra el parásito a una dilución de 1:50, Considerándose como una Seroprevalencia moderada. El fundo, de Santa Rosa presentó una Seroprevalencia baja ($4.7 + 4.5 \%$ 4/86), mientras que en el de Nuñoa fue moderada ($22.2 + 5.9 \%$, 42/189), existiendo diferencias estadísticas significativas entre ambos fundos. No se encontraron diferencias significativas entre grupos etéreos ($p < 0.05$). Este estudio confirma la presencia de *N. caninum* en llamas hembras de la provincia de Melgar, Puno (Moya, 2003).

La Seroprevalencia de *N. 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 (Atoccsa, 2005).



La investigación se realizó en las cuencas de producción láctea: Taraco en la provincia de Huancané, Progreso en el distrito de Asillo- Azángaro y la microcuenca de Cabanillas de la Región Puno, con el objetivo fue determinar *N. caninum* y algunos factores de riesgo asociados, Los resultados para la Seroprevalencia del VDVB en Taraco fue de 65,94%, Progreso 58,49% y Cabanillas 25,0%. La Seroprevalencia de *N. Caninum*, en Taraco fue de 9,42%, Progreso 8, 49% y 0% para Cabanillas. El estudio confirma elevada Seroprevalencia para el VDVB, bajo para *N. caninum* y coexistencia de ambos en bovinos lecheros de las cuencas de Tarace, Progreso y Cabanillas de la Región Puno (Chauca, 2010).

Una investigación sobre ganado vacunos Brown Swiss del distrito de Caracoto provincia de San Román cuyo objetivo de evaluar la Seroprevalencia de *N. caninum* en vacunos según sexo, edad. El tamaño de muestra fue de 85 vacunos, el método de diagnóstico fue ELISA, El resultado de La Seroprevalencia general de *N. caninum* fue de 4.71 %. La Seroprevalencia del *N. caninum* en vacunos machos fue 9,09% y hembras 4.05 % ($p>0.05$). La prevalencia de la *N. caninum* en animales menores a dos años fue 7.14% y en mayores de 2 años 3.51% ($p>0.05$) (Banegas, 2018).

2.2 MARCO TEORICO

2.2.1 Neospora Caninum

La Neosporosis se diagnosticó en 1984 por primera vez, en Noruega siendo descrito el nuevo género *Neopora caninum* en 1988; el primer aislado en cultivo celular y en el ratón a partir de muestras de cerebro y músculos de origen canino, permitió el desarrollo de una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico serológico; también desarrollaron una prueba de inmunohistoquímica para la detección del parásito en tejidos de animales infectados, se realizaron estudios sobre la ultraestructura de los taquizoítos, bradizoítos y quistes tisulares, describieron por primera



vez al parásito como agente etiológico de abortos en el ganado bovino, Los mecanismos de transmisión puso de manifiesto la importancia de la transmisión vertical del parásito, a comienzos de la década de los 90, se reconoció a la neosporosis como la principal causa de aborto en el ganado bovino lechero evidenciándose al perro como el hospedador definitivo; así mismo, se han desarrollado nuevas pruebas diagnósticas indirectas, como el enzimoimmunoensayo (ELISA) la prueba de aglutinación directa y el Western blot y directas como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Dubey, 2007).

2.2.2 Taxonomía

Subreino: Protozoos

Phylum: Apicomplexa

Subclase: Coccidia (Coccidiasina)

Familia: Sarcocystidae

Género: Neospora

Especie: *N. Caninum* (Ribó, 1997).

2.2.3 Ciclo Biológico

El ciclo biológico consta de dos fases de reproducción, siendo una sexual y otra asexual.

- La fase sexual ocurre en el hospedador definitivo como, por ejemplo, el perro el cual se contamina ingiriendo los tejidos contaminados con *N. caninum* de feto abortados. En los intestinos del hospedador definitivo se originan los Ooquistes, excretándose en las heces las cuales contaminan los pastos. Los huéspedes intermediarios, se tiene a los bovinos, estos ingieren los ooquistes con que puede ser el alimento o agua contaminada y estos se abren en el intestino para transformarse en taquizoitos que se dividen y se distribuyen por todo el organismo. Siendo capaz de cruzar la placenta e



infectar el feto. Y es el huésped quien desarrolla una respuesta inmunitaria, formando los quistes tisulares en el sistema nerviosos del huésped (McAllister *et al.*, 1996).

- La fase asexual, se origina con la liberación de esporozoitos, en la células entéricas se transformándose en taquizoitos de replicación rápida, diseminándose a diversas células, Posteriormente a la diseminación de los taquizoitos para posterior a esto realizarse la formación de los bradizoitos, enquistándose en quistes tisulares y cuya localización es el tejidos nervioso, la ingestión del quiste tisular da reinicio al ciclo en el hospedero definitivo (Dubey *et al.*, 2007; Fisher y McGarry, 2007).

2.2.4 Estructura del *Neospora Caninum*

Para poder estudiar su estructura se tuvo que aislar *in vitro*, para purificarlo en un elevado número de taquizoitos para la obtención y análisis de sus proteínas. Las proteínas de *N. caninum* se denominan con las siglas MIC o MAP (proteínas asociadas a micronemas); los gránulos densos contienen proteínas denominadas GRA; las proteínas de roptrias (orgánulo secretor especializado. Son orgánulos en forma de club conectados por cuellos delgados al polo apical extremo del parásito. La proteína roptria ayuda a la movilización del protozooario) se denominan ROP y los antígenos de superficie se designan como SAG o SRS. En las *N. caninum*, las proteínas homólogas las han caracterizado empleando el prefijo “Nc” (Howe *et al.*, 1999)

2.2.5 Agente Etiológico

Neospora caninum es un protozoo intracelular obligado perteneciente al Phylum Apicomplexa y a la familia Sarcocystidae. Mediante microscopio electrónico se reconocen organelos característicos de ese Phylum como: micronemas, roptrias y gránulos densos; este parásito es morfológicamente similar a *Toxoplasma gondii* y está



relacionada taxonómicamente a otros protozoos formadores de quistes como *Hammondia heydomi* e *Isospora bigemina*,

Los estadios parasitarios en un ciclo son:

a. Taquizoitos

Los taquizoitos se dividen por endodiogénesis en forma rápida, mide aproximadamente 7,5 μm aprox. (3- 7 μm) de longitud, (1- 5 μm) de ancho, tiene entre 6-16 roptries y en algunos casos presentaron entre 4-6 roptries localizados posterior al núcleo, raramente se observa un microporo. Son de forma ovoide, semilunar o globosa (Andresen, 1999).

b. Bradizoitos

Los bradizoitos se dividen por endodiogénesis, en forma lenta, encontrándose dentro de los quistes titulares, miden aproximadamente 7-8 μm presentan un número menor de roptries, morfológicamente son similares a los taquizoitos, los quistes titulares han sido observados en tejido nervioso y muscular (Anderson *et al.*, 2000).

c. Quistes

Es un estado en el hospedador intermediario; los quistes en el tejido son ovalados o redondos y miden hasta 107 μm de diámetro y se encuentran primariamente en el sistema nervioso central, dentro de los quistes se encuentran los bradizoitos aproximadamente entre 50 a 500, su pared es lisa y gruesa (Moore *et al.*, 2005).

d. Ooquistes no esporulados

Son los eliminados por los perros infectados experimentalmente, midiendo entre 11.7 a 11.3 mm de diámetro (Lindsay *et al.*, 1999).



e. Ooquistes esporulados

Los Ooquistes no esporulados luego de tres días en el medio ambiente desarrollan dos esporo-quistes con cuatro esporozoitos cada uno morfológicamente similar a los Ooquistes de *T. gondii* y *Hammondia* en perro, los estados enteroepiteliales en el perro no han sido descritos hasta el presente (Paz, 2005).

2.2.6 Epidemiología

El *N. caninum* ha sido identificada en fetos bovinos abortados tanto en ganado lechero como en el ganado de carne, problema que ocurre en casi todos países de los cinco continentes. Además, la infección se ha identificado en casos de aborto endémico, esporádico y en brotes de aborto epidémico en ganado bovino de leche y carne. La neosporosis está considerada como una de las causas principales de aborto y la tasa de prevalencia de la infección por *este parásito*, observada en fetos bovinos abortados enviados para diagnóstico del proceso abortivo y/o utilizados en estudios epidemiológicos en distintos países es muy variable, observándose una mayor prevalencia en aquellas granjas con problemas previos de aborto (Hentrich *et al.*, 1997).

Por otra parte, existe una asociación entre el ganado lechero seropositivo y la presencia de abortos debidos a la infección por *N. caninum* (Paré *et al.*, 1997), hecho que ha sido confirmado con los resultados obtenidos en un estudio encontraron una elevada correlación entre la presencia de anticuerpos en la madre y la presencia del parásito en los fetos abortados (Sager *et al.*, 2001).

La infección por *N. caninum* en el ganado bovino está ampliamente difundida y se ha demostrado una asociación significativa entre la presencia de la infección y el aborto, se señaló por primera vez en 1996 en fetos abortados y en el ganado lechero



adulto, mediante la observación de lesiones específicas y la detección de anticuerpos específicos (González *et al.*, 1996).

El examen inmunohistoquímico de secciones del sistema nervioso central permitió detectar la presencia de pequeñas cantidades de antígeno y establecer un diagnóstico de neosporosis como causa del aborto. Recientemente se han detectado la infección en un 38,8% de los fetos bovinos remitidos para el diagnóstico por al menos una de las cinco técnicas diagnósticas empleadas (histología convencional, inmunohistoquímica, IFI, ELISA y PCR) (Pereira -Bueno *et al.* 2003).

Como denominador común en la mayor parte de los estudios, los fetos fueron enviados para diagnóstico y procedían de ganado bovino lechero. En Suecia, Dinamarca y Bélgica, los primeros diagnósticos de la infección en casos de aborto se realizaron entre 1994 y 1997. En todos los casos los fetos enviados procedían de explotaciones lecheras con problemas de aborto. Así mismo la infección por *N. caninum* es uno de los problemas más importantes en las grandes explotaciones de ganado lechero en la costa oeste de los EE.UU. Desde la primera descripción de la presencia de *N. caninum* en fetos bovinos abortados en ganado lechero en Nuevo México, la infección se ha asociado a la presentación de abortos esporádicos, endémicos o epidémicos en el ganado. En California en base a los resultados del diagnóstico del aborto en fetos enviados a los laboratorios oficiales se considera que la infección por *N. caninum* es la causa más importante de aborto en el ganado bovino lechero (Barr *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 2000; Dubey, 2007).

Posteriormente, los estudios realizados en el ganado lechero de otros países de Europa, América, Oceanía y Asia han confirmado resultados positivos a la *N. caninum*. Sin embargo también se ha identificado al parásito como un causante importante de fallo

reproductor. En Canadá se han realizado diagnósticos de la infección por *N. caninum* en abortos tanto en ganado de leche como de carne al igual que en Argentina (Moore *et al.*, 2005).

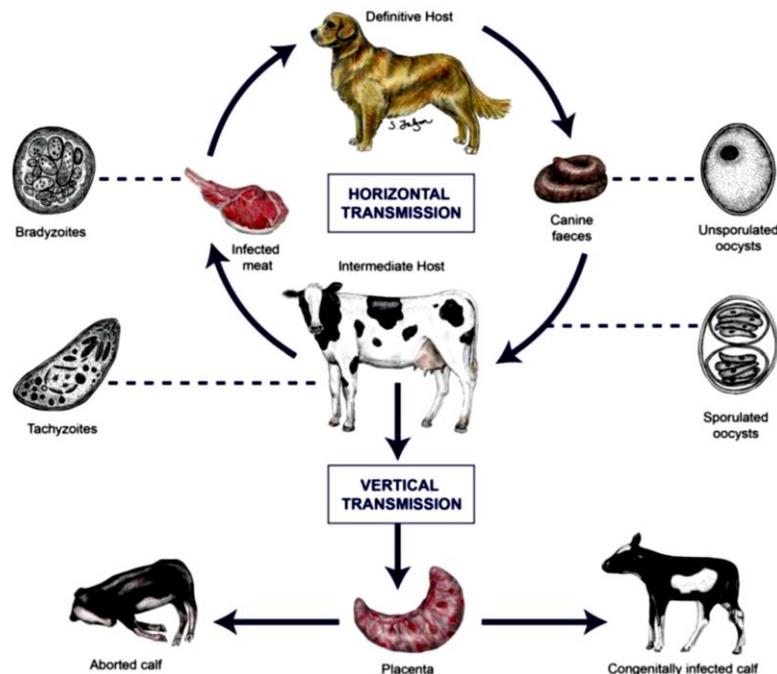


Figura 1. Ciclo biológico de *Neospora Caninum* en bovinos como hospedero intermediario y al perro como hospedero definitivo del ciclo (Goodswen *et al.*, 2013)

2.2.7 Factor de Riesgo

Los diversos estudios de prevalencia realizados en los diferentes hospedadores naturales de la infección ponen de manifiesto una mayor repercusión de esta parasitosis fundamentalmente.

a) 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 *N. caninum* en relación con la edad de los animales lo que indica que la infección en los rebaños se mantiene principalmente por transmisión vertical y que los brotes de aborto atribuibles a la infección son inducidos por factores que estimulan la reactivación de las infecciones crónicas más que debidos a reinfecciones (Paré *et al.*, 1996).

En aborto por la infección por *N. caninum* en ganado lechero no se han observado diferencias significativas entre las tasas de aborto obtenidas en los diferentes grupos de edad de los animales abortados. Además en relación con el aborto, cabe señalar que la infección se ha diagnosticado en fetos abortados por hembras de edad muy variable, identificándose el parásito en fetos abortados de novillas y en fetos abortados de vacas de hasta 11 años de edad (Davison, H, A. 1999).

Sin embargo, en el estudio epidemiológico realizado en Maryland en un hato lechero, se detectó una prevalencia más baja en los animales de 13 y 24 meses de edad en novillos y novillas, habiendo una riesgo creciente en la actividad serológica en vacas de mayor edad (Dyer *et al.*, 2000).

b) Inmunidad

Ante una infección por *N. caninum* los animales desarrollan una respuesta inmune de base humoral y celular. 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 maternal, 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. (Shibahara *et al.*, 1999).



La capacidad inmunitaria va a depender del estímulo antigénico para la formación de células sensibles a antígenos se requiere para la selección clonal y la multiplicación celular inducida por antígenos. Es así que los mamíferos neonatos son vulnerables a la invasión durante las primeras semanas de vida. La madre le brinda en forma de anticuerpo y en linfocitos T. La transferencia pasiva de inmunidad de la madre al neonato resulta esencial para la supervivencia de este (Tizar, 1995).

c) Sexo

En la actualidad la información disponible sobre la influencia del sexo en la presentación de la enfermedad es escasa, ya que todos los estudios realizados en la especie bovina se han llevado a cabo en hembras reproductoras y aún no se dispone de datos sobre la prevalencia de la infección en los machos, las manifestaciones clínicas y el papel que juegan éstos en el ciclo biológico de la *N. caninum*.

d) Raza

La infección por *N. caninum* se ha diagnosticado con mayor frecuencia en los rebaños de razas de aptitud lechera que en los de razas de aptitud cárnica. Sin embargo, en los bovinos no se ha demostrado la existencia de una mayor sensibilidad a la infección en las razas de aptitud lechera que en las de aptitud cárnica (Paré *et al.*, 1998).

Por otra parte, la mayor frecuencia de la neosporosis observada en los rebaños de leche podría estar relacionada con unas condiciones más adecuadas en estas explotaciones para la transmisión de la infección. En el ganado de leche en el que en muchos casos, la reposición se realiza con animales de la misma granja, la infección se transmite principalmente por vía transparentaría sin la participación de un hospedador definitivo que contamine el medio con Ooquistes del parásito, existiendo una tasa de infección congénita elevada. (Schaes *et al.*, 1998).



e) Antecedentes De Fallo Reproductivo

La infección por *N. caninum* es más frecuente en los rebaños con problemas de aborto y mortalidad neonatal que en las explotaciones sin antecedente de fallo reproductivo, observándose tasas de Seroprevalencia intra rebaño más elevadas que aquellos con antecedente de aborto sin este antecedente. Así mismo la tasa de Seroprevalencia individual es más elevada entre los animales con problema de aborto que entre los que no presentan esta manifestación clínica y en el ganado lechero se ha demostrado recientemente que la probabilidad de que los animales que abortan sean seropositivos es tres veces mayor a la probabilidad de que sean seronegativos (Paré *et al.*, 1996).

f) Infecciones Frecuentes

Entre los factores de riesgo de aborto en los bovinos hembras, está asociado a las infecciones frecuentes por otros patógenos. Aunque experimentalmente se ha demostrado que la infección por *N. Caninum* puede inducir el aborto en los bovinos es posible que esta infección no sea la única causa de aborto, nacimiento de animales muertos o enfermos, además no se puede excluir aquellos diferentes factores de infecciones por otros agentes patógenos, agentes inmunosupresores o factores hereditarios que predispongan al aborto de fetos infectados por *N. caninum* (Thurmond ,1997).

En general, en los fetos bovinos abortados con infección por *N. caninum* se ha detectado con poca frecuencia la presencia de otros agentes que pueden ser también causa de aborto en el ganado bovino. Se han identificado simultáneamente infecciones; salmonelas (*Salmonella dublin*), leptospiras (*Leptospira hardjo*), *Bacillus licheniformis* y *Actinomyces pyogenes*, entre otros (Caldow *et al.*, 1998).



Aunque en los bovinos la infección por *T. Gondii* es poco frecuente, además este parásito no se considera una causa de aborto en esta especie, (Gottstein *et al.*, 1998).

g) Tamaño De La Muestra

En cuanto al tamaño de la explotación, apenas existen datos que lo relacionen con la presencia de la infección por *N. caninum*. En EE.UU la infección se ha diagnosticado tanto en explotaciones lecheras de gran tamaño como en rebaños de tamaño más reducido (Anderson *et al.*, 2000).

En Francia, los resultados de un estudio Seroepidemiológico en ganado Normando y Charolés, indicaron que la infección fue más frecuente en los rebaños lecheros considerados de tamaño grande (78 animales) (Klein *et al.*, 1997).

La infección por *N. caninum* fue más frecuente en los rebaños considerados de tamaño medio (11-49 animales) (64%) que en los pequeños (hasta 10 animales) (36%) y en los grandes (50 o más animales) (49%) (Quintanilla-Gonzalo *et al.*, 1999).

h) Estaciones Del Año

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 en los animales con infección crónica durante algunos meses otoño e invierno, 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. En este sentido describieron una asociación entre el aumento de la prevalencia en el



ganado bovino de carne y una mayor cantidad de animales durante la estabulación invernal (Sanderson *et al.* 2000)

2.2.8 Tipos De Transmisión

a) Transmisión horizontal

La transmisión horizontal post-natal o transmisión exógena de la infección es por la ingestión de Ooquistes eliminados en las heces del hospedero definitivo, principalmente el perro. Que contamina el alimento (pastos y forrajes y piensos almacenados) y el agua de bebida y siendo el causante del aborto en el ganado bovino (Moore *et al.*, 2005).

b) Transmisión placentaria vertical

Es el principal modo de infección , dado por la propagación y mantenimiento de la enfermedad, también llamada transmisión congénita. Esta vía ha sido demostrada experimentalmente en ovinos, caprinos, ratones, caninos, felinos, porcinos y primates. Las formas de transmisión transplacentaria vertical son la endógena (Moore *et al.*, 2005).

2.2.9 Patogénesis

La patogénesis del *N. caninum* en el ganado bovino, está relacionado a los mecanismos de la muerte fetal. Y son los bradizoítos alojados en los quistes tisulares del SNC en la hembra bovina gestante, provocando una parasitemia en el animal, ya sea por reactivación de quistes latentes o como resultado de una infección oral. Los taquizoítos atraviesan la placenta produciendo necrosis e inflamación en los tejidos fetales por vía sanguínea (Horna *et al.*, 2003).

En las células infectadas del feto se inicia el proceso de multiplicación mediante endodiogenia que, ocasionando este daño celular con necrosis e inflamación, formándose quistes tisulares capaces de persistir toda la vida del animal. Los mecanismos hormonales



e inmunológicos maternos ocurren durante la gestación, se ha estimado que transcurren 3-4 semanas entre la infección fetal, hasta provocar la muerte fetal o nacer un ternero infectado, que en caso de ser hembra transmitirá la enfermedad a su descendencia, siendo propensa al aborto (Morales, 2001).

2.2.10 Diagnóstico

El diagnóstico de la Neosporosis se debe basar en la historia clínica, signos clínicos, lesiones macroscópicas y microscópicas en los tejidos fetales, cuyo caso del parásito puede ser confirmada por técnicas inmunohistoquímicas (Lindsay y Dubey, 1989; Anderson *et al.*, 2000).

También existen pruebas serológicas como la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) la prueba de Aglutinación Directa y diferentes ensayos inmune absorbentes ligados a enzimas ELISA. Recientemente la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) ha permitido un gran avance en el diagnóstico sin embargo no es muy usado por su elevado costo (Dubey, 2007)

2.2.10.1 Técnicas serológicas empleadas

a) La IFI

Fue la primera prueba serológica empleada en la detección de anticuerpos específicos (IgG) frente a *N. Caninum* en el suero de animales infectados). Posteriormente se ha empleado el enzimoimmunoensayo (ELISA) en el cribado de un número elevado de muestras. Así mismo otras técnicas serológicas como el western blot y la prueba de aglutinación directa también han presentado buenos resultados de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la neosporosis (Dubey *et al.*, 1988)



b) ELISA

Recientemente, se han desarrollado numerosas pruebas ELISA para la detección de anticuerpos específicos, cuya sensibilidad es adecuada y la especificidad elevada. La sencillez y rapidez de su realización y la fácil interpretación de los resultados, la capacidad de automatización y el bajo costo económico son ventajas a tener en cuenta cuando se analizan un número elevado de muestras. Estas pruebas utilizan distintos tipos de antígenos: taquizoítos sonicados, taquizoítos fijados con formalina, antígenos recombinantes o antígenos incluidos en partículas iscom.

En la práctica el ELISA indirecto emplea el antígeno soluble (mezcla de antígenos intracelulares y de membranas de los diferentes aislados de *N. caninum* BPA1 y NC-1) es la técnica de diagnóstico más empleado con mayor para la detección de anticuerpos específicos en suero y líquidos fetales (Bjorkman & Ugglá, 1999).

En la actualidad, se han comercializado diferentes pruebas ELISA basadas en antígeno soluble, como los desarrollados por las casas comerciales IDDEX (Herdcheck®), Hipra (Civtest®) e Intervet (CHEKIT® Bommeli).

Una variante de las pruebas de ELISA convencionales que emplean antígeno soluble de taquizoítos, es el ELISA de competición el cual es una prueba indirecta que incluye el empleo de un anticuerpo monoclonal que compite con los anticuerpos específicos del suero problema por los epítomos disponibles del antígeno fijado en la placa. Una ventaja es que analiza el nivel de anticuerpos que se unen a un único epítomo, lo cual le confiere una mayor especificidad con respecto al ELISA indirecto tradicional. Desarrollaron una prueba de competición para detectar anticuerpos específicos frente al parásito en el ganado bovino, empleando un anticuerpo monoclonal -Mab 4A4-2- dirigido frente al antígeno de superficie de 65 kDa (Baszler *et al.*, 1996)



Recientemente la prueba ha sido validada mediante el análisis de diferentes grupos de sueros de referencia, sugiriendo el empleo de un único punto de corte sin que conlleve un descenso de la sensibilidad o de la especificidad. Por otra parte desarrollaron un ELISA de competición, cuyos valores de sensibilidad y especificidad no pudieron ser calculados debido a la variabilidad existente entre los diferentes laboratorios incluidos en el estudio en relación a la lectura e interpretación de los resultados de la prueba de referencia empleada: la IFI (Dubey *et al.*, 1997).

Williams *et al.*, en 1997 describieron un ELISA que empleaba como antígeno los taquizoítos enteros del aislado de origen canino NC-Liv, fijados con una solución salina formulada. Mediante esta técnica únicamente los antígenos de la membrana celular externa son accesibles a los anticuerpos específicos presentes en el suero aumentando la especificidad. En la actualidad la prueba se ha comercializado con el nombre Mastazyme-Neospora (MAST Diagnostics), normalizado únicamente para el análisis de sueros de origen bovino. La validación se realizó mediante el análisis de sueros procedentes de animales con infección aguda y crónica, obteniéndose diferentes valores de sensibilidad para cada punto de corte considerado (Williams *et al.*, 1999).

Se desarrolló diversas proteínas recombinantes del *N. caninum* que podrían emplearse en nuevas pruebas inmunodiagnósticas basados en el empleo de antígenos recombinante, presenta una serie de ventajas con respecto al ELISA clásico. El ELISA recombinante al emplear uno o varios antígenos específicos de *N. caninum* frente a una mezcla de antígenos que componen el extracto soluble, presenta una mayor especificidad detectándose un menor número de reacciones cruzadas con otros protozoos cercanos.



c) **WESTERN BLOT**

La técnica de western blot se ha utilizado fundamentalmente para estudiar la composición antigénica de *N. caninum*, empleando sueros de diferentes especies infectadas. Entre los antígenos identificados destacan por su intensidad y frecuencia de reconocimiento antígenos inmunodominantes. En cuanto a su utilidad diagnóstica el western blot es una técnica que se ha empleado en escasos estudios de rebaños, utilizado más que todo como apoyo a otras pruebas serológicas IFI y ELISA, el western blot podría sustituir a la IFI como técnica de referencia en el diagnóstico serológico de la neosporosis, debido a que éste presentó una mayor sensibilidad en comparación a la IFI y el ELISA sin que por ello disminuyese la especificidad posteriormente, comprobaron que el diagnóstico serológico fetal mejoraba considerablemente cuando se empleaba el western blot (Schaes *et al.*, 1998).

d) **AGLUTINACIÓN DIRECTA**

La aglutinación directa se basa en la capacidad de aglutinación de los taquizoítos formalizados en presencia de inmunoglobulinas específicas. La prueba, posteriormente, ha incluido una modificación en la cual únicamente se detectan IgG mientras que las IgM son destruidas mediante un tratamiento con mercaptoetanol. En esta técnica de aglutinación directa modificada se basan las pruebas diseñadas para el diagnóstico de la infección por Neospora. La prueba ha demostrado ser bastante específica y en su desarrollo se han empleado los aislados de *N. caninum* BPA-1, obteniéndose en ambos casos una sensibilidad elevada cuando se analizaron sueros de 16 especies diferentes). Sin embargo, en la actualidad se debe evaluar su aplicación en las diferentes especies, razón por la cual no ha reemplazado a las técnicas serológicas IFI y ELISA que se emplean de forma habitual en los estudios epidemiológicos (Packham *et al.*, 1998).



2.2.11 Signos Clínicos

El aborto es el único signo clínico observado en las vacas infectadas. Los fetos abortados están normalmente autolisados o momificados. La edad del aborto oscila entre los 3 y los 8 meses de edad, aunque en su mayoría abortan entre los 4 y 6 meses de gestación. Pueden ocurrir muchos abortos en un período relativamente corto y las hembras bovinas que han abortado nuevamente a causa de *N. caninum* pueden gestar un ternero infectado de forma congénita en el siguiente parto o abortar de nuevo. Los terneros que nacen infectados de forma congénita pueden presentar sintomatología neuromuscular. Los signos clínicos aparecen normalmente 5 días después del nacimiento, aunque pueden aparecer a las dos semanas, con terneros que pueden nacer bajos de peso, débiles e incapaces de ponerse de pie. La temperatura, frecuencia cardíaca y respiratoria son normales. Los miembros anteriores y posteriores de algunos terneros pueden permanecer en extensión rígida. El examen neurológico revela ataxia, reflejos patelares disminuidos y pérdida de la propiocepción de los miembros pélvicos, Las lesiones microscópicas en los fetos abortados están asociadas con la presencia de taquizoitos en cerebro, médula espinal, corazón, y ocasionalmente en los pulmones y los riñones. Las lesiones microscópicas corresponden a encefalitis y miocarditis no supurativa necrotizante multifocal. Cualquier porción de cerebro o de la médula espinal puede tener las lesiones. Es sencillo reconocer las lesiones en el tallo cerebral de los fetos más jóvenes que en el cerebro debido a que allí la autólisis es mucho más acelerada que en el tallo cerebral. Es posible observar taquizoitos y lesiones ocasionalmente en la placenta (Jimmy, 2001).



CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1 ZONA DE ESTUDIO

Las muestras serológicas del presente trabajo de investigación se obtuvieron de vacunos del Centro Experimental Chuquibambilla y el análisis se realizó en el laboratorio de salud animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional del Altiplano con Sede en el Centro Experimental Chuquibambilla, que se ubica en el distrito de Umachiri, provincia de Melgar de la Región Puno, a una altitud de 3915 m.s.n.m.

3.2 POBLACION - MUESTRA

El número de animales a estudiarse, se determinó mediante el método de muestreo al azar, tomando como referencia para el cálculo de una prevalencia del 36% considerando los resultados reportados por la Provincia de Melgar, Puno (Atocsa, 2005) con un nivel de confianza 95% y con un error de precisión mediante la siguiente formula (Miranda, 1987).

$$n = \frac{z^2 pq}{d^2}$$
$$n = \frac{(1.96)^2 (0.36) (0.64)}{(0.1)^2} = 88.51$$

n= número de vacunos

z^2 = valor de Z al 95% de confiabilidad

p= proporción esperada 0.35

q=1-p (diferencia de proporción)

d^2 = grado de precisión del muestreo al 90%

Cuya distribución se presenta en la siguiente tabla, Según edad y raza, Vacunos mayores de 2 años y menores de 2 años, ya que representan un grupo de riesgo. Se consideró las razas Brown Swiss, Aberdeen Angus, Charoláis y Criollo. Las muestras de sangre fueron tomadas de vacunos del Centro, obtenidas durante el año 2019.

Tabla 1. *Número de vacunos distribuidas según edad y raza del Centro Experimental Chuquibambilla para determinar la Seroprevalencia de N. Caninum*

Edad	Razas				Total
	Brown Swiss	Charoláis	Criollo	Aberdeen Angus	
mayor de 2 años	11	11	1	11	44
menor de 2 años	11	11	1	11	44
Total	22	22	2	22	88

3.3 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS:

3.3.1. Toma de muestra sanguíneo

La toma de muestras de sangre se procedió con la sujeción del animal luego se realizó hemostasia a nivel del tercio inferior del cuello, se desinfecto el área de la venopunción. En la que se extrajo aproximadamente 5 ml de sangre de la vena yugular. Las muestras fueron recolectadas en tubos al vacío (vacutainer) sin anticoagulante, los tubos son colocados en posición inclinada, luego se realizó la centrifugación a 3,500 rpm durante cinco minutos. Posteriormente a ello, los sueros sanguíneos se aislaron en viales y se congelo a - 20°C, hasta el momento del trabajo en el laboratorio de Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia con sede en el Centro Experimental Chuquibambilla.



3.3.2. Materiales para la toma de muestra de sangre

- Agujas Hipodérmicas 20 G X 1 ½.
- Frascos colectores de suero sanguíneo (viales criogénicos) x 2mL
- Tubos vacutainer de 6 ml
- Algodón.
- Alcohol yodado al 3%
- Lapiceros de tinta indeleble.
- Pipetas automáticas y manuales.
- Guantes de exploración.
- Agujas Hipodérmicas 20 G. X 1 pulgadas.

3.3.3. Materiales para la prueba de ELISA.

- Micro pipetas de precisión.
- Tips de 10µl y de 100µL
- Probetas graduadas de 500µL
- Bandejas.
- Papel toalla.
- Algodón.
- Agua destilada.
-

3.3.4. Reactivos.

- Placa tapizada con antígeno de *Neospora caninum*.
- Control negativo (Negativo control ELISA 1 x 0.9 mL).
- Control positivo (Positivo control ELISA 1 x 0.9 mL).



- Conjugado 1 x 24ml.
- Diluyente de la muestra.
- Substrato TMB n °12.
- Solución de frenado n°3.
- Solución de lavado concentrada (10X).

3.3.5. Equipos de Laboratorio

- Estufa incubadora a 37°C
- Refrigeradora convencional
- Congeladora a -20°C
- Potenciómetro.
- Cronómetro de tiempo.
- Lector de ELISA ChroMate Manager
- Micro pipeta canal simple 20 a 200 µL
- Micropipeta canal simple 100 a 1000 µL
- Micro pipetas multicanal 50 – 300 µL

3.4 METODOLOGÍA

3.4.1. Procedimiento del test de ELISA

- Tomar la placa tapizada y anotar la posición de las muestras
- Se dispensa 90 µL de Diluyente de Muestra en cada pocillo
- Se dispensa 10 µL de Control Negativo (CN) en dos pocillos
- Se dispensa 10 µL de Control Positivo (CP) en dos pocillos
- Se dispensa 10 µL de muestra en los pocillos apropiados
- Se homogenizo los contenidos de los micropocillos utilizando un agitador



de placas

- Se cubrió la Placa o se selló herméticamente y se incubo por 1 hora a una temperatura de 37° C.
- Se eliminó el contenido de cada pocillo y se lavó cada pocillo con aproximadamente con 300 µl. de solución de lavado por 3 veces y luego se eliminó el fluido de lavado residual de cada pocillo golpeando sobre papel absorbente
- Se dispenseo 100 µl. de Conjugado en cada pocillo
- Se selló herméticamente la Placa y se incubo por 1 hora a una temperatura de 37° C.
- Se eliminó el contenido de cada pocillo y se lavó cada pocillo con aproximadamente con 300 µl. de solución de lavado por 3 veces y luego se eliminó el fluido de lavado residual de cada pocillo golpeando sobre papel absorbente
- Se dispenseo 100 µl. de Sustrato TMB n 12 en cada pocillo.
- Se incubo por 15 minutos a una temperatura de 18 a 24 °C
- Se dispenseo 100 µl. de solución de frenado n 3 en cada pocillo
- Se ha leído los resultados con un fotómetro de longitud de onda de 450 nm a través de la lectora de ELISA

3.4.2. Descripción y principios del KITS

Las placas de microtitulacion se suministran tapizadas con antígeno inactivado. Las diluciones de las muestras que van a ser procesadas se incuban en los pocillos. Cualquier anticuerpo específico frente a *N. caninum* se une al antígeno que tapiza los pocillos y forma un complejo antígeno anticuerpo en la superficie del pocillo. El material que no ha quedado unido se elimina de los pocillos mediante lavado. A continuación, se añade un conjugado formado por una IgG antirumiante unida al enzima peroxidasa, el cual es susceptible de unirse a los anticuerpos de rumiantes que formaron el complejo con



el antígeno de *N. caninum*. El conjugado no unido se elimina mediante lavado y se añade un sustrato TMB a los pocillos. El grado de color desarrollado (densidad óptica medida a 450 nm, tras la adición de la solución de frenado) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo específico frente a *N. caninum* presente en la muestra. La relevancia diagnóstica del proceso se obtiene comparando la densidad óptica de los pocillos con muestra, con la densidad óptica de los pocillos que contienen el control positivo.

3.4.3. Cálculo de la Seroprevalencia

Para estimar la Seroprevalencia de *N. caninum* se realiza mediante la fórmula:

$$\text{Prevalencia} = \frac{\text{Numero de muestras positivas}}{\text{Número total de muestra}} \times 100$$

Cálculos de los controles:

Control Negativo (CN)

$$\text{CNX} = \frac{\text{CN1 A (450)} + \text{CN2 A (450)}}{2}$$

$$\text{CNX} = \frac{\text{CP1 A (450)} + \text{CP2 A (450)}}{2}$$



Calculo de la muestra

Muestra A (450) - CNX

$$M/P \% = 100 X \text{-----}$$

CPX - CNX

Interpretación de los resultados

Negativo: M/P % < 30

Dudoso: M/P % < 40

Positivo M/P % ≥ 40

3.5. ANALISIS ESTADISTICO

Para las variables edad y raza de la Seroprevalencia del *N. caninum* se realizó la prueba estadística Ji cuadrada cuya fórmula es la siguiente:

$$X_c^2 = \frac{\sum(O_i - E_j)^2}{E_j}$$

Donde:

X_c^2 = Valor de ji-cuadrado.

Σ = Sumatoria.

O_i = frecuencia de valor observado.

E_j = frecuencia de valor esperado.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Seroprevalencia general de *Neospora caninum*.

La Seroprevalencia general de *N. Caninum* en el Centro Experimental de Chuquibambilla en vacunos de las Razas Brown Swiss, Aberdeen Angus, Charoláis y Criollo se muestra en la Tabla 2, donde de las 88 muestras procesadas se encontraron 4 vacunos que son positivos al *N. caninum* representando el 4.55%, mientras que el 95.45% de los animales son negativos a la enfermedad.

Tabla 2. Seroprevalencia general de *N. caninum* en vacunos del Centro Experimental Chuquibambilla

Seroprevalencia	N	%
Positivos	4	4.55
Negativos	84	95.45
Total	88	100

Estos resultados indican que en la zona de estudio existiría una propagación de *Neospora caninum*, debido a que existen animales infectados con el parásito, teniendo al hospedador cerca, ya que los pastores crían un perro al menos para el cuidado del hato; corroborado por McAllister *et al.* (1996); Barling *et al.* (2000); Gondim *et al.* (2004), quienes mencionan que el perro puede eliminar más de 500 000 ooquistes, después de alimentarse con el tejido infectado; por lo que la convivencia de perros y bovinos dentro del establo incrementa el riesgo de transmisión de neosporosis; lamentablemente, esta es



una práctica común en los establos, al permitir que los perros se alimenten de los restos placentarios producto de abortos o partos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, mediante la técnica de ELISA indirecta, resultan ser muy inferiores a los estudios de Cardona et al. (2015) quienes reportaron 74.7 % de seroprevalencia; lo cual confirma la evidencia de circulación antigénica de *N. caninum* en las ganaderías bovinas de Montería, Córdoba (Colombia); al igual que lo reportado por Rivera (2000) quien encontró el 62.1 % (18/29) de anticuerpos contra *N. caninum*, cuyas vacas presentaron una alta incidencia de abortos ; así mismo Oña (2015) obtuvo un 61% de positividad al parásito, y Granados (2014) encontró una prevalencia de 46.7 ± 7.2 % (85/182) los distritos de Matahuasi y Santa Rosa presentaron la mayor seroprevalencia de 68.7% y la menor con 17.8%. El contraste con estos estudios indica que la alta prevalencia de *N. caninum*, los que podrían deberse a la introducción de vacas de otras zonas, sin previo descarte de enfermedades reproductivas como la neosporosis; así como a adquisiciones locales de ganado, con el fin de mejorar la genética de las poblaciones en las cuencas lecheras; otro factor podría ser la presencia del hospedero (perro) definitivo en las zonas de pastoreo o criaderos establecidos en cercanía con centros urbanos (McAllister *et al.*, 1996).

Por otro lado, nuestro resultado encontrado fue levemente inferior a los estudios realizados por otros autores como el Tuemmers *et al.* (2017) quienes encontraron un 21.1% (92/437) de las muestras positivas a *N. caninum*, mientras que 13.9% (61/437), Silva (2003) encontró el 29.6 ± 5.1 % (90/304) de los animales presentó anticuerpos contra el parásito; Montiel-Peña et al. (2011) reportaron una prevalencia general de neosporosis de 20.8 %, de igual forma los estudios de Atocsa (2005) con la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) encontró para la Provincia de Melgar un 18.10 % de prevalencia; igualmente Portocarrero *et al.*(2015) encontraron una seroprevalencia de



18.8 ± 3.9%; Huarachi (2008) reporta en vacunos Brown Swiss y criollos del CIP Chuquibambilla 15.28 % de seroprevalencia a neosporosis; esta diferencia se debería a la permanencia de vacas seropositivas (transmisión vertical) dentro del hato, presencia de caninos que conviven con los bovinos dentro de los establos y falta de medidas higiénicas sanitaria (Barling *et al.*, 2000), tanto en los establos muestreados como en los alrededores. Estos canes pueden defecar libremente sobre el alimento o dentro de los corrales, por lo que existen las condiciones propicias para que se realice la transmisión horizontal del perro al ganado o viceversa.

Existen reportes con similares porcentajes al presente trabajo, como el de Chauca (2010), quien encontró una Seroprevalencia para el *Neospora caninum*, en Taraco de 9,42%, Progreso 8, 49% y 0% para Cabanillas de la región de Puno; al igual que al estudio realizado por Oviedo (2007) en vacas con desordenes productivos de la finca de Montería Colombia encontrando una seropositividad de 10,2%; Laura, (2010), quien encontró 9.42% de prevalencia en vacunos del distrito de Taraco, 8.49% de prevalencia para vacunos del Centro Poblado de Progreso; Ramos (2019) la Seroprevalencia general de *N. caninum* fue de 8.64 %; Banegas (2018) encontró prevalencias similares al presente estudio con la misma técnica de diagnóstico, en donde reporta que el distrito de Caracoto tiene un 4,71%; Thurmond *et al.* (1997) menciona que las diferencias en la prevalencia varían en función del país, región, técnica diagnóstica utilizada, tamaño de muestra seleccionado y características del muestreo., corroborado también por Barling *et al.* (2001); Fort *et al.* (2015); quienes indican que existe una asociación entre la Seroprevalencia y los factores de manejo.

4.2. Seroprevalencia de *Neospora Caninum* en vacunos según edad.

Los resultados del estudio de Seroprevalencia de *N. caninum* en vacunos según edad, en el Centro Experimental Chuquibambilla; se presenta en la Tabla 3 encontrándose para vacunos menores de 2 años una seroprevalencia de 4.54 % y para vacunos mayores de 2 años de 4.54 % .

Tabla 3. Seroprevalencia de *N. caninum* en vacunos según edad, del Centro Experimental Chuquibambilla

Edad	Animales	Positivos	
	Muestreados	(+)	%
menores de 2 años	n = 44	2	4.54
mayores de 2 años	44	2	4.54
Total	88	4	

Los resultados de la Tabla 3, no mostraron diferencia estadística ($p \geq 0.05$) lo que nos indica que la edad no influye en el grado de infección en vacunos Centro Experimental Chuquibambilla, sin embargo, es notable que en ambas edades se tiene un porcentaje bajo, pero esta condición pudiera aumentar si no se tiene el control de la crianza de canes, del personal que tiene a su cuidado del hato de vacunos.

Un estudio en Moquegua (Mamani, 2007) determinó que en edades entre 2 a 3 años presentaron una prevalencia con 50% de casos positivos en vacunos de 4 a 6 años con 61,40 % de casos positivos, de 7 a 9 años 37,78 % positivos, más de 10 años 18,18 %; Oña (2015) determinó una seroprevalencia de 45%, estableciendo a la edad como un factor de riesgo; Contreras (2011) reportó una seroprevalencia según edad es 66,67 % a



los 8 años y 25 % a los 2 años; Granados (2014) en cuenca de Mantaro, Junín determinó que vacas de 3 a 9 años de edad 46.7% confirmando una relación con la edad; Bedoya *et al.* (2018) en estudios de seroprevalencia de *N. caninum* en Colombia indican que según la edad las prevalencias más bajas se presentaron en vacunos jóvenes de 17 meses de edad 19.8% y que las más altas prevalencias se encontraron en vacuno mayores a 3 años mayores de edad 31.1%. Estas diferencias se deberían a muchos factores, como lo indican Jensen *et al.* (1999); Dyer *et al.* (2000); Sanderson *et al.* (2000); Rinaldi *et al.* (2005); y concluyen que un factor importante que influye en la seroprevalencia de *N. caninum* es la edad de los bovinos, quedando demostrado que la seropositividad se incrementa con la edad determinando .

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, son inferiores a los estudios de Montiel-Peña *et al.* (2011) donde reporta que hembras de dos años de edad tuvieron la seroprevalencia más baja (15.2 %), seguidas del grupo de tres años (24.1 %); en hembras de cuatro a siete años de edad la prevalencia se mantuvo en el rango de 20 a 24 %; al igual que la investigación realizada en Melgar, Puno por Atoccsa (2005) quien determino una seroprevalencia moderada de acuerdo a la edad en bovinos lecheros con 18.1%; Repiso *et al.* (2004) mostró una prevalencia para vacas de 14.03 % (314/2237) y para vaquillonas 13.05 % (291/2230); Ramos (2019) reporta una prevalencia para animales menores a dos años fue 8.33% y en mayores de 2 años 8.88%; diferencias que se deberían al factor edad es decir que existe una seropositividad que se incrementa con la edad determinando (Sanderson *et al.* (2000); Rinaldi *et al.* (2005).

Existen datos similares a la presente investigación como el de Banegas (2018) quien encontró una prevalencia en vacunos menores de 2 años fue de (7.14%) y mayores

de 2 años (3,51%). A pesar que nuestros resultados, muestran que la edad no se relaciona con la seropositividad ni incrementa el riesgo de infección, esto se debería al factor manejo seria, quien disminuye el riesgo en la presentación de la infección, por lo que se hace necesario establecer medidas sanitarias de control y prevención a fin de evitar su incremento, también se recomienda las evaluaciones serológicas periódicas del ganado para poder descartar las vacas seropositivas.

4.3. Seroprevalencia de *Neospora caninum* según Raza.

Los resultados del estudio de seroprevalencia de *N. caninum* en vacunos del Centro Experimental Chuquibambilla; se presenta en la en la Tabla 4; cuyos datos son de 0, 9.09, 4.54, 4.54 % para vacunos Brown Swiss, Charolais, Criollo y Aberdeen angus respectivamente.

Tabla 4. Seroprevalencia de *N. caninum* en vacunos según raza del Centro Experimental Chuquibambilla

Raza	N° total de animales muestreados	<i>N. caninum</i>		
		Negativo	%	positivo
Brown Swiss	22	22	0	0
Charoláis	22	20	9.09	2
Criollo	22	21	4.54	1
Aberdeen Angus	22	21	4.54	1
Total	88			

Los datos de esta tabla 4 para la seroprevalencia según razas, no muestran diferencias significativas ($p \geq 0.05$), lo cual indicaría que la raza no es un factor que influya en la presentación de neosporosis. En esta Tabla 4 también se observa una seropositividad nula numéricamente, en vacunos de la raza Brown Swiss, esto podría



deberse al manejo que se les da a estos vacunos en el Centro experimental Chuquibambilla como productores de leche, control realizado más en lo que respecta a sanidad y en la crianza de canes; a diferencia de los vacunos de las otras razas como Charoláis presentan un 9.09% de seropositividad esto podría ser por que el pastor de este hato presento 3 canes para el apoyo del pastoreo, y en las razas de Aberdeen Angus y Criollo presentaron 4.54% la cual también se observó la crianza de 1 perro en cada hato, por lo cual nos daría la razón; como lo indica McAllister *et al.* (1996) Quienes mencionan que la presencia de perros en las explotaciones ganaderas representa un factor de riesgo importante, dado que los canes expulsan los ooquistes del parásito en sus heces, facilitando la transmisión de la neosporosis, como también lo mencionado por Basso *et al.* (2001) quienes indican que la convivencia de perros y bovinos dentro del establo incrementa el riesgo de transmisión de neosporosis.

Tuermers *et al.* (2017) mencionan que las mayores frecuencias de seropositividad se encuentran en animales Hereford (36.4%), Angus Rojo (36.0) y Normando (37.5%), y en animales mestizos 17.1%; Bedoya *et al.* (2018) reportan una prevalencia de 11.7 % menor en animales cruzados (Holstein x Gyr) que en vacas Holstein (29,1%) y Jersey (27,1%); López *et al.* (2007) reportan la presencia de anticuerpos para IgG contra Neospora de para Holstein de 39,9% y de 2 % para. Estos estudios dan a conocer que más que el factor raza, estaría influenciando el factor de la presencia de canes en el hato de bovino como indica Paré *et al.* (1998; Basso *et al.*, 2001). La presencia de perros en las explotaciones ganaderas representa un factor de riesgo importante, dado que los canes expulsan los ooquistes del parásito en sus heces, la tenencia de tres o más perros representa un riesgo 3.21 veces mayor de infección en el hato que en ausencia de ellos (McAllister *et al.* 1998), al demostrar que son pocos los



ooquistes eliminados a partir del día 8 de la infección y que estos son excretados irregularmente por un corto periodo.

En la investigación realizada por Chauca (2010) en el distrito de Asillo, se evidencio que la seroprevalencia a la neoporosis en bovinos de la raza Brown Swiss fue de 9.42%; por otro lado Ramos (2019) reportó una prevalencia de la *Neospora caninum* de 8.64 %; así mismo Banegas (2018) encontró que para la raza Brown Swiss su prevalencia fue de 4.71%. Estas diferencia posiblemente se deban a que en el altiplano el *N. canino* estaría en proceso de ingreso de este agente en esta zona, pudiera deberse también a que existe un control sanitario de los canes es decir control en la cantidad como en las desparasitaciones periódicas realiza en el Centro Experimental Chuquibambilla.



V. CONCLUSIONES

1. La Seroprevalencia general de *Neospora caninum* en el Centro Experimental de Chuquibambilla en vacunos es de 4.55%.
2. La seroprevalencia según edad fue de 4.53 % tanto para animales mayores de 2 años y para animales menores de dos años ($p \geq 0.05$).
3. La seroprevalencia según raza fue de 0, 9.09, 4.54 y 4.54 para vacunos Brown Swiss, Charolais, Criollo y Aberdeen angus respectivamente ($p \geq 0.05$).



VI. RECOMENDACIONES

- Implementar un sistema de monitoreo y cuarentena a los animales que presenten la enfermedad y en especial con las nuevas vacas de reposición introducidos en el hato ganadero.
- Realizar programas de desparasitación de canes, así como también programa de destrucción de placentas y fetos siendo la incineración la forma más viable evitando así que los perros lo consuman y continúen en el ciclo biológico del parásito.
- Desarrollar programas de prevención y control sobre la enfermedad de *N. Caninum*, con el fin de no aumentar la prevalencia
- Al personal de trabajo, facilitar con charlas sobre la importancia de la prevención de este parásito, para impedir la proliferación de esta enfermedad



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson M., Adrianarivo A., Conrad P. (2000). Neosporosis in cattle. Anim. Reprod. Sci.
- Andresen H. (1999). Neosporosis en el Perú y en el Mundo. Mv. Revista de Ciencias Veterinarias.
- Atoccca J., Chávez A., Casas E., Falcón P. (2005). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros criados al pastoreo en la provincia de Melgar, Puno. Rev. Inv. Vet. Perú. Vol. 16, Lima enero/junio.
- Baszler, T.V., Knowles, D.P., Dubey, J.P., Gay, J.M., Mathison, B.A., McElwain, T.F. (1996). Serological diagnosis of bovine neosporosis by *Neospora caninum* monoclonal antibody-based competitive inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol. 34(6): 1423-1428.
- Bedoya H, Guimaraes M, Martins R, Polo G, Caetano A, (2018). Seroprevalence And risk factors for *Neospora caninum* infection in cattle from the eastern, Antioquia, Colombia. Veterinary and Animal Science, Volume 6, Pages 69-74.
- Banegas D. (2018). “Seroprevalencia de *Neospora Caninum* en Vacunos Brown Swiss en el distrito de Caracoto - Puno”. Tesis. Universidad Nacional del altiplano.
- Barr, B. C., Anderson, M. L., Dubey, J. P., Conrad, P. A. (1991). Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet.Pathol. 28, 110-116.
- Bjorkman, C., Naslund, K., Stenlund, S., Maley, S. W., Buxton, D., Ugglá, A.(1999). An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. J Vet Diagn Invest.
- Bjorkman, & Ugglá, A. (1999). Neospora species infection in a herd of dairy cattle. Journal of the American Veterinary Association.
- Caldow, G. L. (1998). Bovine abortion outbreak associated with Neospora and other



- infectious agents. *Vet.Rec.* 142, 118-119.
- Chauca E. (2010). "Seroprevalencia y Factores de Riesgo Asociados al Virus de la Diarrea Viral Bovina y *Neospora Caninum* En Tres Cuencas Lecheras de la Región Puno. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del altiplano.
- Davison, H, A. (1999).ignificance of *Neospora caninum* in British diary cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle and aborting cattle. *Int. J. Parasitol.*
- Dyer, R. M., Jenkins, M. C., Kwok, O. C., Douglas, L. W., Dubey, J. P. (2000). Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. *Vet.Parasitol.*
- Dubey, J.P., and D.S. Lindsay. (1996). A review of *Neosporin caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol.*
- Dubey, J.P., G. Schares, and L. Ortega-Mora. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *Neosporin caninum*. *Clin Microvial Rev.*
- Fisher, M., y J, McGarry. (2007). *Fundamentos de Parasitología en Animales de Compañía 1ra Edición (español)*. Editorial Inter-Medica. Buenos Aires.
- Gibney EH, Kipar A, Rosbottom A, Guy CS, Smith RF, Hetzel U, Trees AJ, Williams DJ, (2008). The extent of parasite-associated necrosis in the placenta and foetal tissues of cattle following *Neospora caninum* infection in early and late gestation correlates with foetal death. *International journal for parasitology* 38 (5), 579-588.
- Goodswen, S. (2013). A review of the infection, genetics, and evolution of *N. caninum*: From the past to the present.
- Gottstein, B., Hentrich, B., Wyss, R., Thur, B., Busato, A., Stark, K. D., Müller, N. (1998). Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int.J.Parasitol.* 28, 679-691.



- Guzmán, L. (2017). Seroprevalencia y factores de riesgo de la infección por agentes.
- Granados, S. (2014). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros de cuatro distritos del Valle del Mantaro, Junín, V.1,4.
- Hentrich, B., Waldvogel, A., Hemphill, A., Müller, N., Wyss, R., Hässig, M., Bruckner, L., Gottstein, B. (1997). Comparative assessment of molecular and immunodiagnostic methods based upon experimental and natural *Neospora* sp infection. Proceedings EU COST820 Annual Workshop. Oxford, UK, September, 82.
- Horna, S., Chávez, A., Rivera H., Casas, E., Serrano, E. (2003). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en caninos de dos distritos de la provincia de Chachapoyas. Rev. Invest. Vet. Perú. Vol. 14, No 2 Lima jul. dic.
- Howe, D. K., Sibley, L. D. (1999). Comparison of the major antigens of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Int.J.Parasitol. 29, 1489-1496.
- Huarachi, G. (2005). Seroprevalencia de *N. caninum* en vacunos del Centro de Investigación y Producción Chuquibambilla de la Provincia de Melgar -Puno. Tesis Mev. Vet y Zoot. UNA-Puno.
- <https://www.google.com/maps/dir//Chuquibambilla/>
- Jimmy J. (2001). *N. caninum*, Una Zoonosis Potencial Rev. Salud Pública. Colombia 3 (1): 89-93.
- Klein, F., Hietala, S., Berthet, H., Very, P., Gradinaru, D. (1997). *Neospora caninum*: enquête sérologique sur les avortements des bovines normands et charolais. Le Point Veterinaire. 88, 1283-1286.
- Lavado A. (2015). Determinación de Factores de Riesgo y Medidas Preventivas para la infección por *Neospora caninum* en Ganado Bovino Lechero de Pequeños Productores Apoyados por el Instituto de Desarrollo Agropecuario de la Región



- del Libertador General Bernardo O'Higgins. Tesis. Universidad de Chile
- Lindsay, D., J.P. Dubey, and R.B. Duncan. (1999). Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet Parasitology*.
- Mamani J (2007). Seroprevalencia *Neospora caninum* en Bovinos Lecheros en el valle de Moquegua, Distrito de Moquegua, Provincia Mariscal Nieto y Departamento de Moquegua-2007. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario y Zootecnista. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú. 85 pp.
- McAllister, M.M., A.M. McGuire, W.R. Jolley, D.Sc. Lindsay, A.J. Trees, and R.H. Stobart. (1996) Experimental neosporosis in pregnant ewes and their offspring. *Vet Parasitol*
- MINAGRI. (2016). Sistema de Estadística e Información Agraria. Lima.
- Ministerio de agricultura y riego. (2017). Dirección general de políticas agrarias, Dirección de Estudios Económicos e Información Agraria Primera Edición - enero 2017.
- Moore, D., Odeón A, Venturini, M., Campero, C. (2005). Neosporosis bovina: Conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. *Rev. Argent. Microbiol.* Vol. 37 N° 4, oct/dic. ISSN 0325-7541.
- Montiel, Tomas., Romero, Dora., García, Zaferino., Medina, Leticia., y Cruz, Carlos. (2011). Neosporosis bovina en ranchos ganaderos de la zona norte del estado Veracruz, México. *Tropical And Subtropical Agroecosystems*, 13, 469-479. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93920942025>.
- Morales, C. (2001). Detección de terneros con infección congénita con el virus de la Diarrea viral bovina en hatos lecheros de la Provincia de Arequipa. Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario- UNMSA



- Moya, R, (2003) F.1; Amanda Chávez V.2, 3; Eva Casas A.2; Enrique Serrano M.2; Néstor Falcón P.4 y Danilo Pezo C.5. Seroprevalencia de *N. caninum* en llamas de la provincia de Melgar, Puno.
- Moore, D. 2005. Neosporosis in South America. Vet. Parasitol.
- Oña A. William E. (2015). Determinación de *N. caninum* en el cantón Cayambe: relación canina – bovino. Universidad Central Del Ecuador Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Tesis. Quito.
- Oviedo T, Betancur C, Maestra A, González M, Mestra P, Reza L. Rev.MVZ: Estudio serológico sobre neosporosis en bovinos con problemas reproductivos en Montería, Córdoba, Colombia. Junio (2007). Vol. 12(1): Pág. 929-933. URL Disponible en: www.unicordoba.edu.co/revistas/revistamvz/mvz-121/121-7.pdf.
- Packham, A. E., Sverlow, K. W., Conrad, P. A., Loomis, E. F., Rowe, J. D., Anderson, M. L., Marsh, A. E., Cray, C., Barr, B. C. (1998). A modified agglutination test for *Neosporin Caninum*: development, optimization, and comparison to the indirect fluorescent-antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay. Clin. Diagn Lab Immunol. 5, 467-473.
- Paré J, Thurmong M.C., Hietala S.K. (1996). Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhoo mortality. Canadian Journal of Veterinary Research.
- Paré, J., Thurmond, M. C., Hietala, S. K. (1997). Neospora caninum antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. J.Parasitol. 83, 82-87.
- Paz, V. (2005). Neosporosis en Bovinos y caninos. Mon. Electr. Patol Vet. 2(1): 17-33. ISSN 0718-0780.
- Pereira-Bueno, J., Quintanilla-Gozaolo, A., Seijas-Carballedo, A., Costas, E., Ortega-



- Mora, L. M. (2003). Observational studies in *Neospora caninu* infected dairy cattle: pattern of transmission and age-related antibody fluctuations, in: Hemphill, A., Gottstein, B. A European perspective on *Neospora caninum*. Int. J. Parasitol. 30: 906-909.
- Portocarrero Carlos, Rosa Pinedo, Néstor Falcón, Amanda Chávez V. (2015). Factores de Riesgo Asociados a la Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos Naturalmente Infectados en la Ceja de Selva de Oxapampa, Perú. Rev. Inv Vet Perú (2015); 26(1): 119-126.
- Quintanilla-Gozaolo, A., Pereira-Bueno, J., Tabares, E., Innes, E. A., Gonzalez-Paniello, R., Ortega- Mora, L. M. (1999). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in dairy and beef cattle in Spain. Int.J.Parasitol.
- Ramos I. (2019). “Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Vacunos Brown Swiss en las comunidades del distrito de Ilave”. Tesis. Universidad Nacional del altiplano.
- Ramos, I. (2019). “Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Vacunos Brown Swiss en el distrito de Ilave- Puno”. Tesis. Universidad Nacional del altiplano.
- Ribó, R. (1997). Infección por *Neospora caninum* en perro: descripción de un caso clínico. pág. 106
- Rivera, H. (2001). Etiología infecciosa del aborto bovino. Rev. Inv. Vet. Peru Supl. 1: 95-99.
- Rivera, H., Nelson, D., Tabachi, L. (2000). *Neospora caninum* y otros agentes en fetos abortados de bovinos lecheros del valle de Lima. Rev. Inv. Pec. IVITA (Perú).
- Sager, H.; Fisher, I.; Furrer, K.; Strasser, M.; Waldvogel, A.; Boerlin, B (2001). A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. Vet. Parasitol.



- Schares, G., Peters, M., Wurm, R., Barwald, A., Conraths, F. J. (1998). The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analyzed by serological techniques. *Vet. Parasitol.* 80, 87-98
- Shibahara, T., Kokuho, T., Eto, M., Haritani, M., Hamaoka, T., Shimura, K., Nakamura, K., Yokomizo, Y., Yamane, I. (1999). Pathological and immunological findings of athymic nude and congenic wild type BALB/c mice experimentally infected with *Neospora caninum*. *Vet. Pathol.* 36, 321-327.
- Silva, P. (2003). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima. Tesis de Médico Veterinario, facultad de Med. Veterinaria UNMSM. Lima, Perú. 42 p
- Silva, P. (2003). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima. Tesis de Médico Veterinario, facultad de Med. Veterinaria UNMSM. Lima, Perú. 42 p.
- Tizard, I.R., (1995). *Immunology: An introduction*, 43 edition. Saunders College Publishing, New York
- Thurmond, M. C., Hietala, S. K. (1997). Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. *Am.J.Vet.Res.* 58, 1381-1385.



ANEXOS

ANEXO 1

Cuadro 1. Resultados ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.308	0.342	2.174	0.244	0.248	0.260	0.257	0.204	0.248	0.211	0.212	0.358
B	0.310	0.302	0.214	0.225	0.278	0.239	0.268	0.295	0.260	0.263	0.335	0.229
C	1.416	0.304	0.195	0.217	0.210	0.226	0.239	0.273	0.242	0.179	0.233	0.265
D	1.610	0.298	0.243	0.252	0.243	0.207	0.258	0.290	0.292	0.223	0.230	0.297
E	0.343	0.226	0.226	0.233	1.662	0.271	0.265	0.381	0.403	0.322	0.294	0.370
F	0.283	0.329	0.285	0.299	0.236	0.232	0.215	0.346	0.332	0.243	1.043	0.243
G	0.346	0.307	0.231	0.301	0.206	0.248	0.287	0.238	0.314	0.248	0.263	0.261
H	0.353	0.346	0.259	0.230	0.209	0.257	0.293	1.597	0.284	0.242	0.322	0.221

Cálculos de control de Kit ELISA según inserto IDEXX

- **Control Negativo (CN)**

$$CN = \frac{CN1 A (450) + CN2 A (450) 2}{2}$$

Donde:

$$CN1 = 0.308$$

$$CN2 = 0.310$$

$$CN = \frac{0.308 (450) + 0.310 (450) 2}{2}$$

$$CN = 139.05$$

- **Control Positivo (CP)**

$$CP = \frac{CP1 A (450) + CP2 A (450) 2}{2}$$

Donde:



$$CP1 = 1.416$$

$$CP2 = 1.610$$

$$CP = \frac{1.416 (450) + 1.610 (450)}{2}$$

$$CP = 680.85$$

- **Calculo de Muestras:**

$$M / P \% = 100 X \frac{\text{Muestra A (450)} - \text{CN X}}{\text{CP X} - \text{CN X}}$$

Interpretación

Negativo: $M/P \% < 30$

Dudoso: $30 \leq M/P \% < 40$

Positivo: $M/P \% \geq 40$

Cuadro 2. Resultados de las muestras inserto IDEXX de *N. Caninum*

N° Muestra	Densidad Óptica	M/P %	Resultado
1	0.308	-0.083	Negativo
2	0.310	0.083	Negativo
3	1.416	91.944	Positivo
4	1.610	108.056	Positivo
5	0.343	2.824	Negativo
6	0.283	-2.159	Negativo
7	0.346	3.073	Negativo
8	0.353	3.654	Negativo
9	0.342	2.741	Negativo
10	0.302	-0.581	Negativo
11	0.304	-0.415	Negativo
12	0.298	-0.914	Negativo
13	0.226	-6.894	Negativo
14	0.329	1.661	Negativo
15	0.307	-0.166	Negativo
16	0.346	3.073	Negativo
17	2.174	154.900	Positivo
18	0.214	-7.890	Negativo
19	0.195	-9.468	Negativo
20	0.243	-5.482	Negativo
21	0.226	-6.894	Negativo



22	0.285	-1.993	Negativo
23	0.231	-6.478	Negativo
24	0.259	-4.153	Negativo
25	0.244	-5.399	Negativo
26	0.225	-6.977	Negativo
27	0.217	-7.641	Negativo
28	0.252	-4.734	Negativo
29	0.233	-6.312	Negativo
30	0.299	-0.831	Negativo
31	0.301	-0.664	Negativo
32	0.230	-6.561	Negativo
33	0.248	-5.066	Negativo
34	0.278	-2.575	Negativo
35	0.210	-8.223	Negativo
36	0.243	-5.482	Negativo
37	1.662	112.375	Positivo
38	0.236	-6.063	Negativo
39	0.206	-8.555	Negativo
40	0.209	-8.306	Negativo
41	0.260	-4.070	Negativo
42	0.239	-5.814	Negativo
43	0.226	-6.894	Negativo
44	0.207	-8.472	Negativo
45	0.271	-3.156	Negativo
46	0.232	-6.395	Negativo
47	0.248	-5.066	Negativo
48	0.257	-4.319	Negativo
49	0.257	-4.319	Negativo
50	0.268	-3.405	Negativo
51	0.239	-5.814	Negativo
52	0.258	-4.236	Negativo
53	0.265	-3.654	Negativo
54	0.215	-7.807	Negativo
55	0.287	-1.827	Negativo
56	0.293	-1.329	Negativo
57	0.204	-8.721	Negativo
58	0.295	-1.163	Negativo
59	0.273	-2.990	Negativo
60	0.290	-1.578	Negativo
61	0.381	5.980	Negativo
62	0.346	3.073	Negativo
63	0.238	-5.897	Negativo
64	1.597	106.977	Positivo



65	0.248	-5.066	Negativo
66	0.260	-4.070	Negativo
67	0.242	-5.565	Negativo
68	0.292	-1.412	Negativo
69	0.403	7.807	Negativo
70	0.332	1.910	Negativo
71	0.314	0.415	Negativo
72	0.284	-2.076	Negativo
73	0.211	-8.140	Negativo
74	0.263	-3.821	Negativo
75	0.179	-10.797	Negativo
76	0.223	-7.143	Negativo
77	0.322	1.080	Negativo
78	0.243	-5.482	Negativo
79	0.248	-5.066	Negativo
80	0.242	-5.565	Negativo
81	0.212	-8.056	Negativo
82	0.335	2.159	Negativo
83	0.233	-6.312	Negativo
84	0.230	-6.561	Negativo
85	0.294	-1.246	Negativo
86	1.043	60.963	Positivo
87	0.263	-3.821	Negativo
88	0.322	1.080	Negativo
89	0.358	4.070	Negativo
90	0.229	-6.645	Negativo
91	0.265	-3.654	Negativo
92	0.297	-0.997	Negativo
93	0.370	5.066	Negativo
94	0.243	-5.482	Negativo
95	0.261	-3.987	Negativo
96	0.221	-7.309	Negativo

ANEXO 2

TRABAJO DE CAMPO

Figura 1: Vacuno de la raza Charoláis.



Figura 2: Vacuno de la raza Aberdeen Angus.



Figura 3: Vacuno de la raza Brown Swiss.

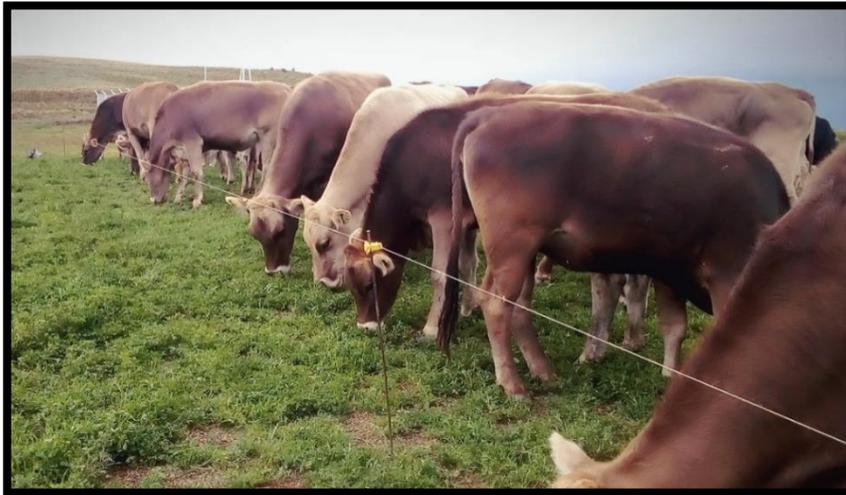


Figura 4. Toma de muestras.



Figura 5: Placa tamizada con antígeno de *Neospora Caninum*

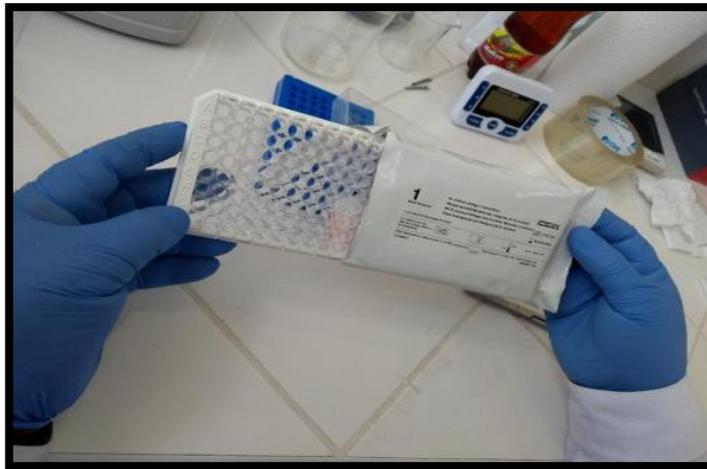
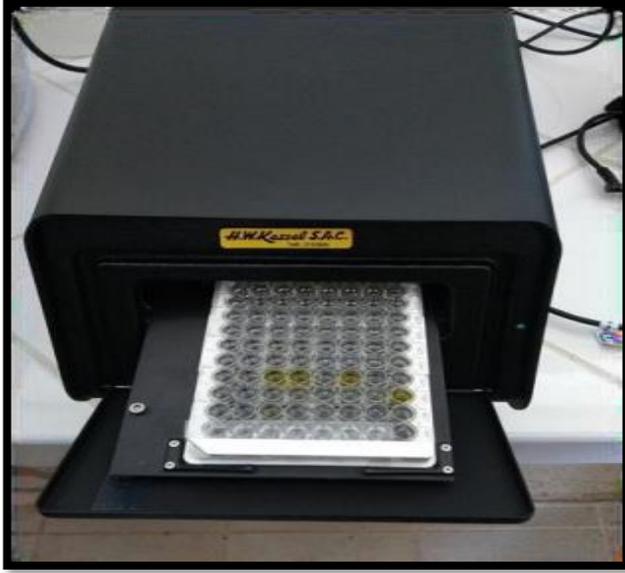


Figura 6: Procedimiento de *Neospora Caninum* según IDEXX.



Figura 7. Lectura de Densidad Óptica.





Anexo 3

Pruebas de chi-cuadrado por raza

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	2,095 ^a	3	0.553
Corrección de continuidad ^b	0.000	1	1.000
Razón de verosimilitud	2.868	3	0.412
Asociación lineal por lineal	0.207	1	0.649
N de casos válidos	88		

Pruebas de chi-cuadrado por edad

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	0.000 ^a	1	1.000
Corrección de continuidad ^b	0.000	1	1.000
Razón de verosimilitud	0.000	1	1.000
Asociación lineal por lineal	0.000	1	1.000
N de casos válidos	88		

Anexo 4



