

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

*Trabajo de titulación previo
a la obtención del título de
Médica Veterinaria Zootecnista*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

**“PREVALENCIA DE *NEOSPORA CANINUM* EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*)
MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA COMPETITIVO”**

AUTORA:

NIDIA FERNANDA CRIOLLO MOLINA

TUTOR:

ING. MAURICIO XAVIER SALAS RUEDA

CUENCA - ECUADOR

2021

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Nidia Fernanda Criollo Molina con documento de identificación N° 1004862908, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana, la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“PREVALENCIA DE *NEOSPORA CANINUM* EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*) MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA COMPETITIVO”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Médica Veterinaria Zootecnista*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre de 2021.



Nidia Fernanda Criollo Molina

C.I. 1004862908

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“PREVALENCIA DE NEOSPORA CANINUM EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*) MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA COMPETITIVO”**, realizado por Nidia Fernanda Criollo Molina, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, noviembre de 2021.



Ing. Mauricio Xavier Salas Rueda, Ms.C

C.I. 0603329681

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Nidia Fernanda Criollo Molina con documento de identificación N° 1004862908, autora del trabajo de titulación: **“PREVALENCIA DE NEOSPORA CANINUM EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*) MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA COMPETITIVO”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, noviembre de 2021.



Nidia Fernanda Criollo Molina

C.I. 1004862908

DEDICATORIA

Después de tanto tiempo veo alcanzado uno de mis sueños más grandes, ser Médica Veterinaria Zootecnista, hoy quiero dedicar este trabajo especial de grado:

A Dios Todopoderoso por ser la luz y mi guía en todos los momentos de mi vida y ayudarme a dar este paso muy importante, a mis padres por habernos apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me han permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor y el apoyo incondicional que me permitieron llegar a esta estancia de mi vida, a mis hermanos por estar siempre acompañándome en cada etapa de mi vida y ayudándome de manera incondicional para llegar a triunfar.

Y a todas aquellas personas que colaboraron conmigo, quienes deben sentirse orgullosos de lo que he llegado a ser.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mis agradecimientos a:

A Dios por todas las bendiciones en mi vida, por guiarme a lo largo de mi existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad, a mis padres: José y Rosa, por ser los principales promotores de mis sueños, en especial a mi madre por confiar y creer en mis expectativas, por los consejos, valores y principios que me han inculcado, a mis hermanos: Estela, Carlos, Susana, Alfredo, Paty, Fabián, Santy, Ana que con sus palabras me hacían sentir orgulloso de lo que soy y de lo que les puedo llegar a ser.

A mis docentes de la Universidad Politécnica Salesiana, Dr. Patricio por ser un excelente docente y director de carrera, Dra. Mónica por todas las palabras de motivación y superación que me han ayudado a crecer como persona, Ing. Pedro Webster, Dr. Juan, Dr. Pedro, Dr. Cristian a todos ellos por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi profesión.

Un agradecimiento especial a mi director de tesis al Ing. Mauricio, por ser un gran docente un amigo quien con su experiencia, conocimiento y motivación me oriento en la investigación, por brindarme la apertura necesaria para culminar mi trabajo.

A Christian quien estuvo en mis momentos más difíciles por impulsarme y ayudarme a culminar esta etapa, a mis amigos, con todos los que compartí dentro y fuera de las aulas, aquellos que se convierten en amigos de vida y aquellos que serán mis colegas, gracias por todo su apoyo y diversión.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Problema.....	16
1.2. Delimitación.....	17
1.2.1. Espacial.....	17
1.2.2. Temporal.....	17
1.2.3. Académica.....	18
1.3. Explicación del problema.....	18
1.4. Objetivos	18
1.4.1. General.....	18
1.4.2. Específicos	18
1.5. Hipótesis.....	19
1.5.1. Hipótesis nula.....	19
1.5.2. Hipótesis alternativa.....	19
2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMETAL.....	20
2.1. Generalidades	20
2.2. Aspecto histórico.....	21
2.3. Epidemiología y distribución geográfica.....	23
2.4. Etiología y taxonomía.....	23
2.5. Estadios parasitarios	25
2.5.1. Taquizoítos.....	25

2.5.2.	Bradizoítos	25
2.5.3.	Ooquiste	26
2.5.4.	Esporozoíto	27
2.6.	Ciclo biológico	27
2.6.1.	Rutas de infección.....	29
2.7.	Patogénesis.....	29
2.8.	Lesiones y manifestaciones clínicas.....	30
2.8.1.	Lesiones	30
2.8.2.	Signos.....	31
2.9.	Estudios previos de métodos de diagnóstico.....	31
2.9.1.	IFI.....	33
2.9.2.	ELISA	33
2.9.3.	Inmunocromatografía.....	34
2.10.	Control y prevención	35
2.10.1.	Tratamiento.....	35
2.10.2.	Prevención.....	36
2.10.3.	Consideraciones sobre salud pública	36
2.11.	Resumen del estado de arte del estudio del problema	36
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.1.	Metodología	38
3.2.	Análisis estadístico	38
3.3.	Población y muestra	38

3.3.1.	Selección y tamaño de muestra	38
3.3.2.	Procedimiento de campo	39
3.3.3.	Procedimiento para de laboratorio	40
3.4.	Variables de estudio	43
3.4.1.	Variables independientes: Suero de caninos.....	43
3.4.2.	Variables dependientes: Elisa Competitivo para <i>Neospora caninum</i>	43
3.5.	Materiales	44
3.5.1.	Materias de oficina.....	44
3.5.2.	Materiales de campo	44
3.5.3.	Materiales de laboratorio.....	45
3.5.4.	Materiales químicos	45
3.5.5.	Materiales biológicos	46
3.6.	Consideraciones éticas	46
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1.	Prevalencia de <i>Neospora caninum</i> en caninos.	47
4.2.	Exposición de resultados de pools del cantón Paute y Santa Isabel.....	47
4.3.	Criterio de validación.	49
4.4.	Análisis del comportamiento de la DO en pools.....	49
4.5.	Análisis de resultados obtenidos de sueros individuales.....	51
4.6.	Criterio de validación.	52
4.7.	Análisis del comportamiento de la DO del ensayo de sueros individuales.....	52
4.8.	Prevalencia de <i>Neospora caninum</i> según los cantones.....	54

4.9. Discusión.....	55
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58
4.10. Conclusión.....	58
4.11. Recomendación	59
5. BIBLIOGRAFÍA.....	60
6. ANEXOS.....	66
6.1. Datos de formación de Pools.....	66
6.2. Resultado ELISA del Equipo de ELISA pools	67
6.3. Resultados cálculo de Elisa	67
6.4. Análisis de sueros individuales de pools 9 y 10 del cantón Santa Isabel	68
6.5. Resultado ELISA de sueros individuales	68
6.6. Imágenes de trabajo experimental.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía	24
Tabla 2. Variables independientes	43
Tabla 3. Variable dependientes.....	43
Tabla 4. Materiales de oficina.....	44
Tabla 5. Materiales de campo.	44
Tabla 6. Materiales de laboratorio.	45
Tabla 7. Materiales químicos.....	45
Tabla 8. Materiales biológicos.....	46
Tabla 9. Cuadro estadístico de seroprevalencia de Neospora caninum.....	47
Tabla 10. Resultado detallado ELISA Competitivo de pools del cantón Paute y Santa Isabel.....	48
Tabla 11. Media, mediana, rango y desviación estandar	49
Tabla 12. Resultado detallado ELISA Competitivo de análisis de sueros individuales del Cantón Santa Isabel.....	51
Tabla 13. Cuadro resultado de análisis de muestras de Elisa.	53
Tabla 14. Prevalencia de Neospora caninum según los cantones.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadíos parasitarios de Neospora Caninum (Cortesía laboratorios inmuno parasitología FCV-UNLP).....	27
Figura 2. Ciclo biológico de Neospora Caninum (Cortesía del Dr. Mcallister - Universidad de Illinois). 28	
Figura 3. Desviación estándar de pool.	50
Figura 4. Análisis del comportamiento de la densidad óptica en sueros individuales.....	52
Figura 5. Desviación estándar de sueros individuales.	54
Figura 6. Distribución de prevalencia de Neospora caninum según el cantón.	55

RESUMEN

El impacto global de las enfermedades parasitarias es muy importante ya que produce pérdidas económicas grandes en animales de granja y graves problemas de salud en animales de compañía, se deben a gran medida por la falta de higiene y condiciones ambientales que propician sobre todo en países subdesarrollados. La Neosporosis es una enfermedad parasitaria que ha reportado infecciones en caninos y vacunos que son las especies que mayor estudio se ha realizado en Ecuador, produciendo problemas neurológicos y aborto en estas especies. El presente trabajo de investigación es de tipo descriptivo transversal, se determinó la presencia de anticuerpos de *Neospora Caninum* en pacientes caninos sin manifestaciones clínicas que acudieron a campañas de esterilización en los cantones de Paute y Santa Isabel. Se colectaron un total de 112 muestras sanguíneas, 68 del cantón Paute y 44 del cantón Santa Isabel; las muestras se procesaron mediante la técnica de Elisa competitivo, considerando positivos a pacientes que tuvieron S/P % > 50, dudoso <50 - > 60% y negativo < 60%. Se analizó mediante 12 pools formado por 10 muestras de suero en primera instancia, dando 2/12 muestras como dudoso equivalente a 16.67%. Posteriormente se analizó sueros individuales de los 2 pools dudosos provenientes del cantón Santa Isabel y se obtuvo 2/44 casos positivos con una seroprevalencia de 4.54% y una seroprevalencia negativa de 100% en el cantón Paute. Los datos se analizaron con el programa ID SOFT Vet 5.11.4.

ABSTRACT

The global impact of parasitic diseases is very important since it produces large economic losses in farm animals and serious health problems in companion animals, they are largely due to the lack of hygiene and environmental conditions that favor especially in underdeveloped countries. Neosporosis is a parasitic disease that has reported infections in dogs and cattle, which are the species that have been studied the most in Ecuador, causing neurological problems and abortion in these species. The present research work is of a descriptive cross-sectional type, the presence of Neospora Caninum antibodies was determined in canine patients without clinical manifestations who attended sterilization campaigns in the cantons of Paute and Santa Isabel. A total of 112 blood samples were collected, 68 from the Paute canton and 44 from the Santa Isabel canton; The samples were processed using the competitive Elisa technique, considering positive patients who had S / P% > 50, doubtful <50 -> 60% and negative <60%. It was analyzed by means of 12 pools consisting of 10 serum samples in the first instance, giving 2/12 samples as doubtful equivalent to 16.67%. Subsequently, individual sera from the 2 doubtful pools from the Santa Isabel canton were analyzed and 2/44 positive cases were obtained with a seroprevalence of 4.54% and a negative seroprevalence of 100% in the Paute canton. The data were analyzed with the ID SOFT Vet 5.11.4 program.

1. INTRODUCCIÓN

La relación entre humanos - perros a través de la historia ha sido enigmática, quienes hoy en día han llegado a ser parte integral de la familia, desde simples animales de compañía hasta guardianes de la casa y en otros casos pastores de los animales de producción. (Gómez, Atehortua, & Orrozco, 2007) A través del tiempo, así como ha mejorado su relación en el proceso de domesticación también se ha visto afectado por una serie de enfermedades que ha causado alteración en la salud y el bienestar de los perros, y algunas de ellas han llegado a tener una importancia especial tanto por su potencial contagioso a otras especies como al hombre situándolo como zoonosis.

Uno de los principales objetivos del hombre moderno a través de la historia de la humanidad ha sido tratar de aplicar sus conocimientos científicos en cuanto salvaguardar la salud animal; es así, que, en la práctica veterinaria de pequeñas especies a diario se encuentran una serie de enfermedades de tipo infeccioso que son tratados sin realizar exámenes complementarios que ayuden a identificar el agente primario causante de la enfermedad, llegando a un resultado errado de tratamientos instaurados, incluyendo la muerte del paciente.

En estos tiempos ha adquirido gran importancia una enfermedad infecciosa que afecta una serie de mamíferos dentro de los cuales se encuentran los perros, llamada *Neosporosis canina*, es una enfermedad neuromuscular usualmente caracterizada por parálisis ascendente en perros jóvenes, aunque los casos de enfermedad clínica son escasos, es posible que cause una amplia variedad de signos clínicos en animales de cualquier edad y ha sido mal diagnosticada y confundida con otras enfermedades de etiología nerviosa como el Distemper canino y la Toxoplasmosis (Melo & Peláez, 2012). Esta enfermedad ha adquirido gran importancia a nivel mundial por tener altos índices de prevalencia y ser implicada como una de las principales causas de aborto bovino.

No cabe duda que, desde su descubrimiento, el interés en el campo veterinario por *N. caninum* ha ido en aumento, habiéndose realizado numerosas investigaciones sobre la biología del parásito, así como sobre el diagnóstico, la epidemiología y el control de la enfermedad. (Arranz, 2016)

1.1. Problema

Neospora caninum es un parásito recientemente reconocido que produce infecciones en perros, bovinos y otros herbívoros, es una enfermedad que está asociado tanto animales silvestres como domésticos. Es considerada una enfermedad emergente debido a que producen un impacto económico alto sobre todo en los animales de producción. Los caninos pueden actuar como reservorio para transmitir a otras especies sin manifestar signos clínicos, por ello la importancia de determinar su presencia en los caninos sobre todo los de las áreas rurales que conviven con los bovinos.

El presente trabajo de investigación se realizó con la finalidad de conocer la presencia de *Neospora caninum* en los perros de las zonas de estudio y facilitar información de la presencia de este parásito a las diferentes instituciones públicas y privadas de manera que se puedan realizar un mejor diagnóstico, programas de control y erradicación. Además, nos ayuda a comprobar el uso de Kits de Elisa como herramienta práctica y fácil de aplicar e interpretar por médicos veterinarios y laboratoristas y llegar a un diagnóstico acertado, sobre todo cuando las sintomatologías no son claras y pueden ser confundidas con otras enfermedades.

1.2. Delimitación

1.2.1. Espacial

La siguiente investigación se realizó a partir de las muestras que fueron recolectadas durante las campañas de esterilización en los cantones de Paute y Santa Isabel perteneciente a la provincia de Azuay; ubicados al noreste y al sur de la provincia respectivamente.

Paute se encuentra ubicado en el noreste de la Provincia del Azuay, en la latitud sur $2^{\circ} 46'55''$ y longitud oeste $78^{\circ} 45'6''$. Está conformando un valle interandino ubicado desde los 2100 a 2300 m.s.n.m. que se conecta a la cordillera oriental con temperaturas que van de 15° a 25°C . (Cornejo, Zorrilla, Bermúdez, y Estacio, 2010)

Santa Isabel se localiza en los puntos más extremos $79^{\circ}34'53''\text{W}$ $2^{\circ}54'19''\text{S}$ al Norte, $79^{\circ}16'57''\text{W}$ $3^{\circ}22'14''\text{S}$ al Sur, $79^{\circ}13'15''\text{W}$ $3^{\circ}17'13''\text{S}$ al Este y $79^{\circ}37'30''\text{W}$ $2^{\circ}59'30''\text{S}$ al Oeste. Su clima es variado y presenta temperaturas que varían desde los 8 a los 24°C , con un promedio de 18°C , y se encuentra a una altitud que va desde los 100 hasta los 4000 m.s.n.m. (GAD SANTA ISABEL, s.f.)

Los análisis de laboratorio se realizaron en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana Sede Cuenca campus el Vecino; en los laboratorios de biotecnología, ubicado en la Calle Vieja 12-30 y Elia Liut. Cuenca, Ecuador. Coordenadas, $2^{\circ}53'11''\text{S}$ $78^{\circ}59'23''\text{O}$; $2^{\circ}53'11''\text{S}$ $78^{\circ}59'23''\text{O}$.

1.2.2. Temporal

El desarrollo de esta propuesta se llevó a cabo durante 400 horas que fueron distribuidas en el proceso teórico y experimental.

1.2.3. Académica

El presente trabajo experimental está orientado a la sanidad animal fortaleciendo los conocimientos adquiridos en la rama de la Parasitología que posteriormente nos puede ayudar a un mejor diagnóstico y un tratamiento óptimo y oportuno.

1.3. Explicación del problema

Al ser una enfermedad emergente a nivel mundial, se ha visto la importancia de realizar estudios sobre la presencia de *Neospora caninum* en caninos (*Canis lupus familiaris*) que a menudo puede ser sub-diagnosticada y ser confundida con otras enfermedades infecto-contagiosas o parasitarias, principalmente cobrando gran importancia en aquellas que ocasionan problemas del sistema nervioso como Distemper o Toxoplasmosis. Su estudio en el Ecuador y a nivel mundial ha dado con mayor relevancia en la ganadería lechera que afecta con más severidad a hembras gestantes produciendo abortos y reduciendo la producción lechera; su importancia radica en la estrecha relación que se mantiene entre estas dos especies, ya que requiere de ambas especies para completar su ciclo de vida.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Determinar la prevalencia de *Neospora caninum* en caninos (*Canis lupus familiaris*) mediante el método de ELISA competitivo, de los cantones Paute y Santa Isabel.

1.4.2. Específicos

Determinar la presencia de anticuerpos de *Neospora caninum* en caninos mediante el método de ELISA competitivo.

Calcular la prevalencia de *Neospora caninum* de los cantones Paute y Santa Isabel.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis nula

La prevalencia es alta de *Neospora caninum* caninos en los cantones Paute y Santa Isabel.

1.5.2. Hipótesis alternativa

La prevalencia es baja de *Neospora caninum* caninos en los cantones Paute y Santa Isabel.

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

2.1. Generalidades

El proceso de domesticación de los animales data de tiempos ancestrales, lo que ha traído como consecuencia una amplia distribución de las mascotas alrededor de todo el globo terráqueo, entre las que se destacan los perros domésticos (*Canis lupus familiaris*), los cuales aportan beneficios importantes a sus dueños, especialmente a los niños. Sin embargo, también debe tomarse en cuenta que las mascotas caninas representan una fuente potencial de agentes infecciosos patógenos, incluyendo los de tipo parasitario, especialmente cuando se combinan con factores ecológicos y conductas y hábitos humanos inapropiados. (Morey, 2014)

Dentro de las nuevas problemáticas de la salud animal se destacan las enfermedades causadas por la *Neospora Caninum*, responsable de enfermedades neuromusculares en perros y abortos en el ganado bovino. (Piaggio, Delucchi, Bañales, y Easton, 2007) Es una enfermedad que está distribuida a nivel mundial de la que obviamente nuestro país no está excluido. Los caninos como eslabón importante en el desarrollo de protozoarios despliegan factores que predisponen a la presencia de enfermedades, principalmente los factores coinciden con el contacto de perros con ambientes rurales teniendo diversidad de alimentación con incidencia de consumo alto de carne cruda incluyendo vísceras que aumenta significativamente la posibilidad de infección.

Neospora caninum es un protozoo del tipo Apicomplexa responsable de la enfermedad denominada Neosporosis. El primer caso de infección por *N. caninum* se diagnosticó en 1984 en Noruega (Bjerkas y Presthus, 1989), en un perro con paresia de las extremidades y lesiones de carácter inflamatorio en su sistema nervioso central y muscular, producida por un parásito protozoo formador de quistes, parecido morfológicamente a *Toxoplasma gondii*, pero serológicamente negativo a este protozoario. En 1988 Dubey y colaboradores en EEUU (Dubey y

col., 1988b) identifican un parásito similar y proponen su denominación como un nuevo género, *Neospora*; y como especie tipo *N. caninum*. Ese mismo año los autores consiguen el primer aislamiento del parásito en cultivo celular, desarrollan la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos frente *N. caninum* y ponen a punto técnicas inmunohistoquímicas para la detección del parásito en tejidos infectados. La inoculación experimental a perros confirma a *N. caninum* como causa de las alteraciones neurológicas, paresia, parálisis y muerte en los perros infectados.

2.2. Aspecto histórico

La Neosporosis es una enfermedad de reciente diagnóstico y creciente importancia, que está extendida a nivel mundial. Su agente etiológico, *Neospora caninum*, es un parásito protozoario que en muchos países ha sido caracterizado como la principal causa de aborto bovino. A su impacto económico sobre la producción se agregan importantes trastornos y muerte en animales de compañía.

La aparición de la *N. caninum* se relata desde 1984 por Bjerkas, en Noruega, en cachorros que presentaban alteraciones neuromusculares de los perros; en esa ocasión fue considerado como *T. gondii*, aunque el estudio serológico no fue positivo para este agente. En el año 1988 en Estados Unidos el microorganismo fue aislado de la misma especie recibiendo el nombre de *Neospora Caninum*, asignado por Dubey y col, hasta ese momento la enfermedad era confundida con toxoplasmosis pues se ha establecido que existen sólo 6 pequeñas diferencias antigénicas y ultraestructurales entre *N. caninum* y *T. gondii*, generando así una estrecha relación filogenética entre ambos protozoarios (Álvarez, 2016).

Dubey 1988 obtuvo el primer aislado de *Neospora caninum* en cultivo celular en ratón, a partir de muestras de cerebro y músculos de origen canino, descubriendo una segunda especie en el género *Neospora*, el *N. hughesi* que causa la mieloencefalítis en los equinos. (Naguleswaran, et. al, 2001 pp. 6483–6494.)

La obtención in Vitro del primer aislado de *N. caninum* permitió el desarrollo de una prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico serológico de la Neosporosis y un año más tarde en 1989 se desarrolló la prueba de inmunohistoquímica para la detección del parásito en tejidos de animales infectados. Speer y Dubey en 1989 realizaron estudios sobre la ultraestructura de los taquizoítos, bradizoítos y quistes titulares, como *N. caninum* como agente etiológico de abortos en ganado bovino, aunque estudios retrospectivos demostraron que el parásito ha sido endémico por lo menos desde 1957 en Estados Unidos. (Ibáñez, 2007)

En los caninos, la Neosporosis es una enfermedad neuromuscular usualmente caracterizada por parálisis ascendente en perros jóvenes, aunque los casos de enfermedad clínica son escasos, es posible que cause una amplia variedad de signos clínicos en animales de cualquier edad (Escalona, Corro, Suárez, Castillo, y Pineda, 2013, pp.29-34)

La Neosporosis canina es más prevalente en zonas rurales que en las urbanas y las cifras de prevalencia serológica van de un 29% siendo las más altas en Italia y al 0,2% en las Islas Malvinas. En el Ecuador la mayoría de investigaciones han sido dirigidas a determinar la presencia de *N. caninum* en hatos ganaderos, debido a que es una enfermedad parasitaria que causa abortos y nacimiento de terneros con deficiencia neuromuscular, obteniendo resultados de hasta 71,8% positivas, 25,5% negativas y 2,7% sospechosas a la presencia de anticuerpos *anti-N.caninum* (Lozada, 2004).

2.3. Epidemiología y distribución geográfica

Datos de prevalencia reportados en la literatura tienen una amplia variación, desde un 1% en Islas Malvinas y Suecia hasta un 29% en Italia. Una encuesta realizada en Japón encontró una mayor prevalencia en perros pertenecientes a lechería con infección de *Neospora* (31%), comparada con perros de áreas urbanas (7%). (Patitucci, R., Pérez, Rozas, y Israel, 2001). La prevalencia de edad indica que la mayor parte de perros se infectan después del nacimiento sin embargo se ha reportado una mayor prevalencia en perros viejos que jóvenes.

Los métodos utilizados en reportes indican que se ha realizado estudios de la prevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* utilizando métodos de diagnósticos diversos como: Neospora Agglutination Test (NAT), Immunofluorescence Antibody Test (IFAT), Técnicas directas e indirectas de Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) entre otros. Estos estudios se han realizado en perros de área rural y urbana, dando mayor énfasis en perros que viven en establos de ganado de leche y carne; hay pocos estudios realizados en hospitales de referencia clínica por lo que se dispone poca información de casos clínicos. (De la Cerda, 2015)

La presencia de *N. caninum* es una enfermedad de distribución mundial; que tiene una seroprevalencia amplia en distintos países y conociendo la importancia tanto clínica como zootécnica de esta enfermedad fortalece la necesidad de seguir conociendo el comportamiento de este parásito a nivel mundial, sobre todo a nivel local.

2.4. Etiología y taxonomía

La Neosporosis es una enfermedad causada por un protozooario llamado *Neospora caninum*, parásito intracelular obligado que afecta a caninos y herbívoros como bovinos, ovinos, equinos y cabras. Según la taxonomía, se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 1. *Taxonomía*

Descripción	Denominación
Phylum	<i>Apicomplexa</i>
Clase	<i>Sporozoasida</i>
Subclase	<i>Coccidiasina</i>
Orden	<i>Eimeriorina</i>
Familia	<i>Toxoplasmatidae</i>
Género	<i>Neospora</i>
Especie	<i>Caninum</i>

Fuente (Dubey, Hemphill, Calero, & Schares, 2017, p. 31).

Los integrantes de la familia *Sarcocystidae* se caracterizan por tener ciclos biológicos heteroxenos y formar quistes en el hospedador intermediario. Como tales afectan diferentes especies de herbívoros y omnívoros, y como hospedadores definitivos fundamentalmente, diferentes especies de carnívoros (Pérez, 2004, pp. 4–5).

La ubicación taxonómica de *N. caninum* es aún motivo de debate desde su descripción, inicialmente se la relacionó con tres especies que son de gran importancia en veterinaria y en la salud pública como son: *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* y *Hammondia heydomi*. Estudios filogenéticos basados en el análisis de la secuencia de la subunidad menor del ARN ribosomal (nss-ARNr), mostraron un elevado grado de homología entre *N. caninum* y *T. gondii*, sugiriendo que los dos organismos podrían pertenecer al mismo género (Moore, Venturini, & Campero, 2006, pp. 455-456). El empleo de pruebas diagnósticas serológicas específicas ha permitido diferenciar a *N. caninum* de otras especies gracias a su diferente composición antigénica.

2.5. Estadios parasitarios

La estructura de los zoítos de *Neospora caninum* es común a la de todos los del Phylum *Apicomplexa*. Son de forma oval alargada, y su citoplasma está limitado por una membrana laminar o película reforzada en su cara interna por una serie de microtúbulos que recorren longitudinalmente el cuerpo del zoíto. En el citoplasma se distinguen el núcleo, el aparato de Golgi, varias mitocondrias, el retículo endoplasmático, los gránulos densos (organela de secreción que participa en la adhesión e invasión a la célula hospedadora) y gránulos de amilopectina. En la parte anterior está el complejo apical, constituido por las siguientes estructuras:

- Conoide, organela en forma de cono truncado formado por varias capas de estructuras microfibrilares, dispuestas helicoidamente.
- Roptrias y los micronemas son organelas de secreción que participan en la adhesión e invasión de la célula hospedadora. (SALUVET; Universidad Complutense Madrid, s.f)

Según el tipo de multiplicación o fase del ciclo biológico se distinguen tres tipos de zoítos; taquizoíto, bradizoíto y ooquiste. Los dos primeros están presentes en los hospedadores intermedios, y ocurren intracelularmente, mientras que los ooquistes están presentes en las heces del hospedero definitivo. (Martínez, León, y Álvarez, 2015, pp. 64-73)

2.5.1. Taquizoítos

Son zoítos invasivos asociados a la multiplicación asexual rápida del parásito en las células del hospedador, y que se localiza en una gran variedad de tipos celulares. Es la responsable de la fase aguda de la enfermedad y de la transmisión vertical. (SALUVET, UCM s.f.) Los taquizoítos tienen un tamaño que oscila entre 3-7 μm de longitud y 1-5 μm de anchura y una morfología ovoide, globular o lunar, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren. (Dubey & Lindsay, 1966, pp.1-59).

2.5.2. Bradizoítos

Es la fase de multiplicación lenta en diferentes tejidos y que se encuentran en el interior de quistes tisulares. Los bradizoítos son de aproximadamente 6-8 μm de longitud por 1-1,8 μm de ancho y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor y tienen más gránulos de amilopectina (Speer & Dubey, 1989; Jardine 1996). Los quistes, que pueden contener en su interior hasta 200 bradizoítos pueden medir 100 μm de diámetro siendo de forma redondeada u oval. La pared quística (que puede alcanzar más de 4 μm de espesor) está formada por dos membranas, la externa, una única membrana electrodensa, y la interna de mayor grosor, granular y con estructuras tubulares.

2.5.3. Ooquiste

- No esporulados: Son los eliminados en las heces del hospedador definitivo son esféricos o subesféricos, miden de 10 a 11 μm
- Esporulados: Los ooquistes esporulados, son los que después de tres días en el medio ambiente contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoítos cada uno, son morfológicamente similar a los ooquistes de *T. gondii* y *Hammondia* en el perro (Aycachi, 2005)

El ooquiste puede tener forma esférica, oval o elipsoidal y es la fase de resistencia del parásito eliminada al medio ambiente por el hospedador definitivo. El hospedador elimina ooquistes sin esporular, con un esporonte rodeado por una pared externa e interna. La fase infectante es el ooquiste esporulado, resultante de la multiplicación asexual (esporogonia) del esporonte en el medio ambiente, el cual se divide en dos esporoblastos. Cada esporoblasto se rodea de una pared que se denomina esporoquiste, en cuyo interior por multiplicación asexual se forman cuatro zoítos denominados esporozoítos, que son la fase infectante para el hospedador.

2.5.4. Esporozoíto

Los esporozoítos se encuentran en el interior de los ooquistes, miden 6,5 μm de longitud por 2,0 μm de ancho. Los ooquistes de *N. caninum* son morfológicamente similares a los de *T. gondii* y *H. heydomi*; su tamaño es de 11,7 μm de longitud y 11,3 μm de anchura. La pared del ooquiste es lisa, de 0,6- 0,8 μm de espesor y no contiene micrópilo (Bjerkas & Dubey, 1991, pp. 407-410).

Figura 1. Estadíos parasitarios de *Neospora Caninum* (Cortesía laboratorios inmuno parasitología FCV-UNLP).



2.6. Ciclo biológico

El ciclo completo de este parásito no es muy claro. Sin embargo, como todos los Coccidios, posee un ciclo de vida heteroxeno con 2 hospederos; se ha postulado y confirmado experimentalmente que los caninos son los hospederos definitivos mientras que los herbívoros son los hospederos intermediarios. Aunque el hombre no ha sido involucrado dentro del ciclo de *Neospora caninum*, se ha logrado infectar experimentalmente primates no humanos por lo que podría ser una zoonosis potencial. (Vargas y Cortés, 2001, pp. 88-93)

Su ciclo biológico involucra 3 fases: 1) Fase de multiplicación rápida con formación de tachizoítos, 2) Fase de multiplicación lenta con formación de bradizoítos y 3) Fase sexuada con eliminación de ooquistes.

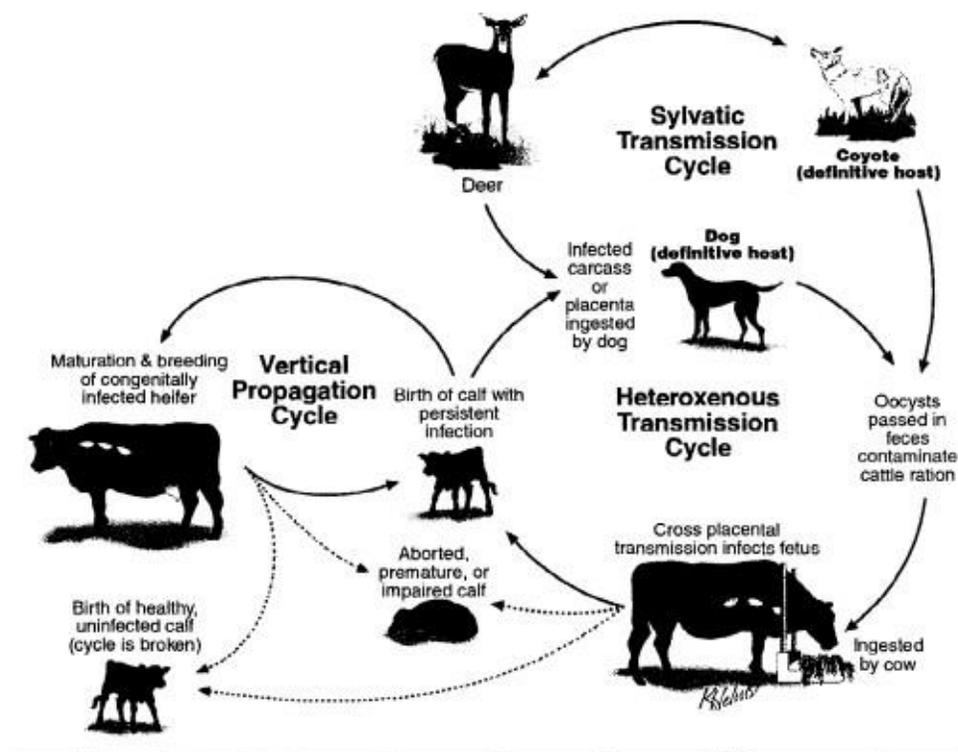
El perro es huésped definitivo y a la vez intermediario. El protozoo comienza su reproducción sexuada en el tracto gastrointestinal del huésped definitivo dando origen a los ooquistes, los cuales son excretados con las heces hacia el medio ambiente, de 5 a 17 días post ingestión de quistes tisulares. Los ooquistes son excretados en forma no esporulada, por cientos de

miles durante el período de eliminación que puede durar semanas, estos esporulan en aproximadamente 3 días, pero en condiciones ambientales favorables pueden hacerlo en 24 horas.

Una vez infectivos, los ooquistes son bastante resistentes a los efectos ambientales y pueden permanecer viables en el suelo, agua y en reservas alimenticias del ganado.

Los perros adquieren la infección principalmente por la ingestión de quistes que contienen bradizoítos de los hospedadores intermediarios infectados, sobre todo del bovino. En una infección natural, el periodo de prepatencia es de 5-9 días y el periodo de patencia generalmente de 11-20 días. Los ooquistes no son infectantes inmediatamente tras la excreción fecal (requieren de uno a tres días de esporulación en el medio exterior). Los ooquistes de *N. caninum* se han aislado a partir de heces de perros desde 45 días a 13 años de edad, y el número de ooquistes por gramo de materia fecal oscila entre unos pocos hasta más de 100.000. (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, 2013, p. 17).

Figura 2. Ciclo biológico de Neospora Caninum (Cortesía del Dr. Mcallister - Universidad de Illinois).



2.6.1. Rutas de infección

La transmisión se puede dar por vía:

- Horizontal: tiene lugar por ingestión de los tejidos de bovinos infectados (fetos abortados y placentas), calostro o leche de origen bovino contaminado con taquizoítos de *N. caninum* la infección causa la eliminación de los ooquistes en las heces del perro.
- Vertical: se da por vía transplacentaria en un 50% de los casos, los cachorros nacen de perras infectadas por *N. caninum*, y solo un 25% de éstos pueden desarrollar signos clínicos. (ESCAP, 2013, p. 16).

En caninos normalmente se da una infección silente y la presentación típica es un cuadro neuromuscular en cachorros entre uno a cuatro meses, ocasionalmente se da mortinatos, pero normalmente no produce abortos; no así en bovinos que es el principal causante de abortos en primer tercio de gestación.

2.7. Patogénesis

Los huéspedes intermediarios ingieren los ooquistes presentes en agua o alimentos contaminados. Los esporozoítos que se encontraban en su interior son liberados en el tracto intestinal, penetran las células y se transforman en taquizoítos que se dividen rápidamente y se distribuyen por todo el organismo, y, suelen estar presentes en huéspedes intermediarios y definitivos, en animales gestantes son capaces de cruzar la placenta para causar infecciones fetales.

Los taquizoítos proliferan hasta que las células del huésped se destruyen y entonces nuevamente infectan otras células vecinas. A medida que el sistema inmune del hospedero comienza a responder, la replicación del protozooario se enlentece y comienza la fase de multiplicación lenta con formación de bradizoítos (forma de división lenta) ubicados al interior de un quiste que se

localizan en el SNC (cerebro, médula, retina). Los quistes permanecen viables hasta por 14 días a 4 °C y son inactivados en 24 horas a -20 °C. Estos quistes tisulares de crecimiento lento, contienen cientos de células infectivas, y pueden mantener la infección en el hospedero intermediario de por vida.

La fase sexuada ocurre en el huésped definitivo. La infección del mismo se produce por la ingestión de tejidos contaminados con taquizoítos o quistes tisulares como fetos y placentas de los animales que abortaron. Los estadios entero-epiteliales dentro del tracto intestinal del huésped definitivo previos a la formación de ooquistes no son bien conocidos, pero culminan con una fase sexuada con eliminación de ooquistes en las materias fecales. Una vez ingresados al huésped, los taquizoítos de *N. caninum* producen focos de necrosis en diversos tejidos, destruyendo las células al multiplicarse activamente en neuronas, macrófagos, fibroblastos, endotelios, miocitos, hepatocitos. (Piaggio, Delucchi, Bañales, y Easton, 2007, p. 15).

2.8. Lesiones y manifestaciones clínicas

2.8.1. Lesiones

La lesión más característica es de encefalitis focal caracterizada por la necrosis y la inflamación no supurativa. No hay lesiones gruesas patognomónicas de Neosporosis. (López, et al. 2007). Otras lesiones que se han observado son focos de necrosis en diversos órganos como cerebro, médula, corazón, músculo esquelético e hígado, a menudo con un infiltrado inflamatorio mononuclear. Aunque los taquizoítos pueden multiplicarse en muchos tejidos, los quistes tisulares sólo se encuentran en encéfalo y médula espinal, aunque hay un reporte de Peters de quistes en músculo de perros y vacunos (Piaggio, Delucchi, Bañales, y Easton, 2007, p. 15).

2.8.2. Signos

En la mayoría de los casos de neosporosis neonatal, los cachorros presentan signos clínicos a partir de las 5-7 semanas tras el nacimiento y con ello se demuestra que *N. caninum* se transmite de la madre a los cachorros en el último periodo de la gestación. En los cachorros, la parálisis creciente causada por *N. caninum* puede ser letal y varios miembros de una misma camada pueden estar afectados si bien no necesariamente a la vez (ESCAP 2013). Las perras infectadas subclínicamente pueden transmitir el parásito a los fetos pudiendo nacer infectadas camadas sucesivas. Sin embargo, no se ha descrito la presencia de aborto en la infección natural del perro.

Los caninos adultos desarrollan paresia de los miembros posteriores, que evoluciona progresivamente hacia una parálisis. Los miembros anteriores están menos afectados que los posteriores que llegan a presentar hiperextensión rígida. También pueden aparecer otros síntomas como la dificultad en la deglución, la parálisis mandibular, la flaccidez muscular, la atrofia muscular e incluso el fallo cardíaco como también signos de dolor en la palpación de los músculos lumbares y/o de los cuádriceps. Los perros con paresia posterior pueden llegar a vivir meses. La enfermedad puede ser localizada o generalizada, y cualquier tejido puede estar afectada, incluida la piel. La Neosporosis puede afectar a perros de cualquier edad. (Pérez. 2004)

2.9. Estudios previos de métodos de diagnóstico

El diagnóstico antemortem se basa principalmente en la historia clínica, edad del perro y los resultados de la serología. Dado que el aislamiento del parásito de fluidos y tejidos y su identificación mediante microscopía resulta difícil, la serología es la prueba más utilizada. (Pérez, 2019)

A la hora de diagnosticar la infección por *N. caninum* en el perro debemos realizar un diagnóstico clínico-epidemiológico, teniendo en cuenta la presencia o ausencia de sintomatología nerviosa, su procedencia y la edad, el cual si bien puede ser indicativo siempre debe confirmarse con un diagnóstico de laboratorio. En los exámenes de hemograma generalmente no muestran alguna sin embargo en la química resultan variables e inespecíficos dependiendo del sistema de órganos afectado, (Dubey & Lappin, 2008). La infección por *N. caninum* estimula la respuesta inmune humoral del hospedador, lo que permite detectar los anticuerpos contra antígenos específicos del taquizoíto o de los bradizoítos de *N. caninum*. También permite la determinación de la etapa aguda, caracterizada por altos niveles de IgM de la segunda a la cuarta semana de infección y de la crónica, con la caída de IgM y el aumento de la IgG. Después de 6 meses de infección primaria, se muestran altos niveles de anticuerpos IgG. (Sinnott, Monte, Collares, Silveira, & Borsuk, 2017, pp. 19-27)

Dado que la enfermedad está causada por la presencia de formas parásitas en los tejidos, el examen coprológico para la detección de ooquistes no es importante en el diagnóstico de la Neosporosis clínica canina. La sospecha clínica de una Neosporosis se puede confirmar mediante técnicas moleculares: la PCR puede llevarse a cabo en muestras de líquido cefalorraquídeo o a partir de biopsias musculares. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se diagnostica a través de la serología: una vez infectados, los animales albergan los quistes tisulares durante toda la vida (De la Cerda, 2015) mientras que en los cachorros seroconvierten a las 2-3 semanas tras la infección generando niveles de anticuerpos altos en los animales enfermos. Por tanto, el diagnóstico de la Neosporosis canina debe basarse en los signos clínicos y en una serología positiva (ELISA e IFI). (ESCAP 2013, p. 17).

2.9.1. IFI

La IFI detecta, fundamentalmente, anticuerpos que se unen a los antígenos localizados en la superficie celular del taquizoíto de *N. caninum*. Fue la primera técnica aplicada al diagnóstico serológico de la Neosporosis y frecuentemente ha sido utilizada como prueba de referencia (Lindsay & Dubey, 1996, pp 1-59).

2.9.2. ELISA

Esta técnica se basa en la detención de antígenos inmovilizados sobre una base sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente atribuyéndole propiedades de inmunoensayo ideal, la facilidad de procesar un gran número de muestras la obtención de una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas de IFI, sumado a la falta de subjetividad al emitir resultados eleva su confiabilidad de los resultados.

Esta técnica se fundamenta por la presencia y la cantidad de un antígeno particular en una muestra desconocida se determina por su capacidad para competir con un antígeno de referencia marcado para unión a un anticuerpo fijo en una placa. Primero, una cantidad determinada de anticuerpo no marcado se fija a un grupo de placas y una preparación de estándar de referencia de un antígeno marcado se une a ellas. A continuación, se añaden diversas cantidades de muestra no marcadas y se mide el desplazamiento del antígeno marcado, lo que genera curvas de inhibición características. Se obtiene una curva estándar al usar cantidades conocidas de antígeno no marcado idénticas a las usadas en la especie marcada y una comparación con esta curva permite calcular la cantidad de antígeno en muestras desconocidas. Durante la incubación, las muestras con alto contenido de antígeno dan como resultado que el antígeno no marcado se une en mayores cantidades que el antígeno conjugado; por lo tanto, cuando se agrega un sustrato cromogénico al

ensayo para desarrollar color, las muestras con una alta concentración de antígeno generan una señal más baja que las que contienen una baja concentración de antígeno, lo que produce una correlación inversa entre la concentración de antígeno en la muestra y el desarrollo de color en el ensayo. Este tipo de reacción es uno de los pocos métodos posibles para estimar la cantidad de antígenos de bajo peso molecular con un número limitado de epítopes o sitios de unión a anticuerpos. (ALLSCIENCE, 2019)

GRA7 es un antígeno de excreción presente en los gránulos densos de *Neospora caninum* y una proteína altamente inmunogénica. Aunque las proteínas GRA parecen estar relacionadas con el desarrollo intracelular del parásito, estudios previos han revelado que la proteína NcGRA7 podría estar involucrada en el proceso inicial de invasión de células huésped por *N. caninum*. Algunos estudios ya publicados han demostrado que los anticuerpos monoclonales generados frente a esta proteína, presentan una alta especificidad y reactividad, lo que los convierte en importantes candidatos para su uso en el desarrollo de ensayos de ELISA competitiva orientados al diagnóstico de infección producida por *N. caninum*. Esta técnica sería especialmente útil en el serodiagnóstico de perros, para los cuales las técnicas serológicas actuales carecen de la sensibilidad y especificidad de las utilizadas en bovinos. (REKOM BIOTECH, 2019)

2.9.3. Inmunocromatografía

La inmunocromatografía es una técnica reciente de inmunodiagnóstico de *N. caninum*. El test comercial de nombre FASTest® NEOSPORA caninum es una prueba rápida y fácil de implementar para la detección cualitativa de anticuerpos contra *N. caninum* en sangre, plasma o suero de perros o ganado bovino. En el caso de muestras positivas, ésta migra a través de una membrana de nitrocelulosa uniendo los anticuerpos con los antígenos de *N. caninum*, formando así una línea de color rosa-morada. (Borries, 2016, p. 7).

2.10. Control y prevención

2.10.1. Tratamiento

Debido a la falta de vacunas y tratamientos efectivos, la mejor estrategia de control para la Neosporosis es un diagnóstico, se han realizado muchos estudios para mejorar la precisión de las pruebas serológicas mediante el uso de proteínas específicas y nuevos formatos de ensayo, que tienen buena sensibilidad y especificidad además de ofrecer menores costos y tiempos de realización. (Sinnott, Monte, Collares, Silveira, & Borsuk, 2017, pp 19-25.)

Cabe mencionar algunos elementos que deben ser tenidos en cuenta al elaborar una estrategia de control. En primer lugar, en los perros, la seroconversión para IgG se produce recién a las 2-3 semanas luego de finalizar la excreción, y algunos no seroconvierten. En segundo lugar, si bien varios trabajos científicos indicaban que los perros no reexcretaban ooquistes luego de un período patente, un trabajo de Gondim del 2005 indica que sí lo hacen luego de un período refractario variable. (Piaggio, Delucchi, Bañales, y Easton, 2007, p. 12).

El tratamiento de la neosporosis clínica en el perro es complicado y parcialmente efectivo: es más eficaz el tratamiento en los estadios precoces antes de la aparición de los signos neuromusculares. Así, cuando los signos clínicos sugieren una Neosporosis se recomienda iniciar el tratamiento inmediatamente antes incluso de esperar a la confirmación serológica. La clindamicina (20 mg/kg, dos veces al día durante 30-60 días) produce una mejoría del cuadro clínico en aquellos perros infectados con signos neurológicos, (ESCAP 2013). De forma alternativa, también puede utilizarse toltrazuril de 15 – 20 mg/kg.

2.10.2. Prevención

Las perras seropositivas pueden transmitir *N. caninum* a los cachorros por tanto se recomienda que las hembras infectadas que presentan la enfermedad de forma crónica sean excluidas de los programas de cría. Además, los perros que viven en granjas deben evitar acceder a carne cruda y evitar la contaminación fecal del agua y el alimento para el ganado bovino. (ESCAP 2013)

Es necesario evitar que los perros contaminen pasturas y concentrados con sus heces debido a que es el principal responsable de la Neosporosis bovina, que puede generar pérdidas significativas en la producción incluyendo abortos, muertes fetales, incremento de tasa de reemplazo y eliminación. (Benavidez, Potosí, y Roque, 2016, pp. 51-54)

2.10.3. Consideraciones sobre salud pública

No existe potencial zoonótico conocido, (ESCAP 2013). Hasta el momento no hay evidencia firme de que *N. caninum* infecte a los seres humanos, puesto que se han reportado bajos niveles de anticuerpos y el ADN del parásito se ha evidenciado en tejido humano. Además, tampoco se ha dado reportes de infecciones por *Neospora* de manera accidental en personas que manipulan organismos contaminados. (Dubey, Hemphill, Calero & Schares, 2017)

2.11. Resumen del estado de arte del estudio del problema

La Neosporosis es una patología que ha sido objeto de estudio en diferentes partes del mundo, debido a las importantes pérdidas económica que esta provoca sobre todo en los bovinos y la preocupación que ha ocasionado de que pueda ser considerada una enfermedad zoonótica y afecte la salud pública.

A pesar de los avances en la medicina veterinaria y el cuidado especial que pueden recibir los canes dentro de la ciudad, en el área rural persisten cuidados de salud rudimentarios o nulos en la

mayoría de los casos; lo cual, propicia que los canes de esta zona padezcan enfermedades parasitarias o infecciosas, representando un impacto económico negativo sobre todo para aquellas familias donde su economía está basada en la crianza da ganado bovino debido a la estrecha relación con los caninos y la predisposición de las enfermedades que pueden generarse, motivo por el cual se requiere tener métodos de diagnóstico más confiables para el diagnóstico de este parásito.

En Ecuador algunas investigaciones han demostrado un alto porcentaje de prevalencia en caninos sobre todo los que han estado en contacto con ganado bovino. Es así que (Barbecho, 2018) obtuvo un 62.14% de prevalencia, estudio realizado en el cantón Cayambe de la provincia Pichincha de muestras obtenidas de las zonas rurales de caninos que convive con bovinos. Así como también (Recalde, 2013) realizó un estudio de prevalencia en el cantón de Quito en caninos procedentes de la zona urbana que acudían a 2 veterinarias obteniendo como resultado una prevalencia de 5% en la veterinaria A y 1% en la veterinaria B; determinado que no requiere necesariamente de contacto con los bovinos para contraer el parásito.

La desparasitación periódica de una mascota es fundamental tanto para la salud del animal como la nuestra, esto permite romper los ciclos de vida y transmitirse a otros animales o incluso alas personas que las rodean. De ahí la importancia de desparasitar debidamente a nuestra mascota desde que es un simple cachorro, momento en el que es especialmente vulnerable a los parásitos, en especial a las lombrices intestinales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Metodología

La presente investigación corresponde a un estudio epidemiológico de tipo descriptivo, prospectivo de corte transversal. Se determinará la presencia de los anticuerpos para el agente etiológico y se calculará la prevalencia de la enfermedad en un momento establecido.

3.2. Análisis estadístico

Por las características de la investigación al ser un trabajo prospectivo y de corte transversal no se desarrolla un análisis estadístico analítico, sino se opta por un análisis estadístico de tipo descriptivo mediante un diseño de gráficas.

3.3. Población y muestra

Se realizó un estudio de tipo exploratorio. Debido a que no existen censos de la población canina de los cantones que fueron obtenidas las muestras, se hizo un muestreo no probabilístico.

3.3.1. Selección y tamaño de muestra

La población de muestra está conformada por caninos entre machos y hembras que fueron reclutados durante las campañas de esterilización realizados en los cantones de Paute y Santa Isabel en los meses de Diciembre (2019) y Enero (2020) respectivamente.

El tamaño de la muestra se estimó considerando la prevalencia con número de población desconocida garantizando la misma que sea representativa de la población de estudio.

Para ello se utilizó la siguiente formula:

$$n = \frac{Z^2 * p * q}{e^2}$$

Donde:

n = Tamaño de la muestra

Z = Nivel de confianza para 95% (1,96)

e = Error estimado (0,05)

p = Probabilidad de que ocurra el evento

q = $(1 - p)$ = Probabilidad de que no ocurra el evento

Nivel de significación = 0.05

$$n = \frac{1,96^2 * 0,05 * 0,95}{0,05^2}$$

$$n = 73$$

El Tamaño Mínimo de la Muestra se identificó en 73 individuos. La prevalencia nos indica el número de casos en un momento determinado, permitiendo ver el porcentaje de la población afectada. Podemos calcular matemáticamente con la siguiente fórmula.

$$p = \frac{\text{Número de casos}}{\text{Población}} * 100$$

3.3.2. Procedimiento de campo

Las muestras sanguíneas se tomaron de la vena cefálica y yugular, con el uso de vacutainer, con previa asepsia en el lugar de punción. Se obtuvo 5 ml de sangre y se colocó en los tubos de ensayo estériles previamente rotulados. Las muestras se mantuvieron a una temperatura entre 4°C y 7°C. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos; se extrajo el suero de todas las muestras con una micropipeta en tubos estériles para suero sanguíneo con previa rotulación.

3.3.3. Procedimiento para de laboratorio

3.3.3.1. Preparación de las muestras.

Para evitar diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras, se preparó 12 pools; 7 del cantón Paute y 5 del cantón Santa Isabel; del total de las muestras obtenidas; a cada pool se agregó 100 μ l de suero de cada individuo para después correr la técnica de ELISA por incubación corta. Para la detección de anticuerpos de *ant-Neospora caninum* se utilizó un Kit Id Screen ® *Neospora caninum Competition multi species* ELISA Kit.

3.3.3.2. Preparación de la solución de lavado.

Se equilibró la Solución de Lavado Concentrada (20X) a temperatura ambiente ($21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) y se agitó bien hasta que la Solución Concentrada esté completamente solubilizada.

Se preparó la Solución de Lavado (1X) diluyendo 1:20 la Solución de Lavado Concentrado (20X) en agua destilada.

3.3.3.3. Procedimiento de ensayo con incubación corta.

Los reactivos estuvieron equilibrados a temperatura ambiente $21^{\circ}\text{C} (\pm 5^{\circ}\text{C})$ antes de la utilización. Se homogenizó por medio de la inversión utilizando un vortex.

1. Se añadió
 - 50 μ l de Diluyente 14 a cada pocillo.
 - 5 μ l de Control Positivo a los pocillos A1 y B1.
 - 45 μ l de Control Negativo a los pocillos C1 y D1.
 - 50 μ l de la muestra a ensayar en los pocillos restantes.
2. Se cubrió la placa y se incubó por 45 min 21°C .

3. Se vació los pocillos y se lavó cada pocillo 3 veces con 300 µl de Solución de Lavado.
4. Se preparó el Conjugado 1X haciendo una dilución 1:10 del Conjugado Concentrado 10X con el Diluyente 12.
5. Se añadió 100 µl del Conjugado 1X a cada pocillo.
6. Se cubrió la placa y se incubó por 30 min a 21°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$).
7. Se vació los pocillos y se lavó cada pocillo 3 veces con 300 µl de Solución de Lavado. Durante todos los procesos de lavados se evitó que los pocillos se sequen entre los lavados.
8. Se añadió 100 µl de la Solución de Revelación a cada pocillo.
9. Se cubrir la placa y se incubó por 15 min a 21°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) en la obscuridad.
10. Se distribuyó 100 µl de Solución de Parada a cada pocillo, en el mismo orden que en el paso 8, para detener reacción.
11. Posteriormente se leyeron en el espectrofotómetro la densidad óptica (DO) de 450 nm.

Una vez conocido los resultados de los sueros enviados al análisis es importante hacer revisión de cómo fue el método para la interpretación de los resultados obtenidos, los mismos que se detallan a continuación:

Validación:

- El valor medio de la D.O del Control Negativo (DO_{CN}) es mayor que 0.7.

$$\text{DO}_{\text{CN}} > 0.700$$

- La razón entre el valor medio de la D.O. del Control Positivo (DO_{CP}) y el valor medio de la D.O. del Control Negativo (DO_{CN}) es menor que 0.3.

$$DO_{CP} / DO_{CN} < 0.3$$

Interpretación:

Por cada muestra, se calculó el porcentaje de competición (S/N %).

$$\frac{S}{N} \% = \frac{DO_{muestras}}{DO_{CN}} * 100$$

Donde:

- DO = Densidad óptica
- CN = Control negativo
- %S/N = Muestra al positivo

Las muestras que presentan un S/N%:

- Menor o igual que 50% fueron interpretados como positivas.
- Mayor que 50% y menor o igual que 60% fueron interpretados como dudosas.
- Mayor que 60% fueron interpretados como negativas.

El análisis de datos se realizó con el programa ID Soft™, que permite calcular los diferentes parámetros del kit criterios de validación y valores S/P.

3.4. Variables de estudio

3.4.1. Variables independientes: Suero de caninos

Tabla 2. *Variables independientes*

Concepto	Categoría	Indicadores	Índice
Unidad experimental que nos facilitará los indicadores	Físico	Machos	Numérico
		Hembras	Numérico
	Biológico	Cantidad de suero	MI
		Positivo	Numérico
		Negativo	Numérico

3.4.2. Variables dependientes: Elisa Competitivo para *Neospora caninum*.Tabla 3. *Variable dependientes.*

Concepto	Categoría	Indicadores	Índice
Método analítico que depende de la reacción AG-AC	Biológico	Cantidad de uniones Ag-Ac	Numérico

3.5. Materiales

3.5.1. Materias de oficina

Tabla 4. *Materiales de oficina.*

Descripción	Unidad de medida	Cantidad
Agenda	Unidad	1
Hojas de papel bond A4	Resma	1
Bolígrafo	Unidad	2
Marcador	Unidad	1
Carpeta	Unidad	1
Computadora	Unidad	1
Cámara digital	Unidad	1
Memoria USB	Unidad	1
Impresora	Unidad	1

3.5.2. Materiales de campo

Tabla 5. *Materiales de campo.*

Descripción	Unidad de medida	Cantidad
Mandil	Unidad	1
Mascarilla	Caja	1
Guantes de examinación	Caja	1
Gorras desechables	Unidad	20
Hojas guía para la técnica de ELISA	Unidad	5

3.5.3. Materiales de laboratorio

Tabla 6. *Materiales de laboratorio.*

Descripción	Unidad de medida	Cantidad
Multicanal de 12 puntas de 300 μ l	Unidad	1
Pipeta de 1000 μ l.	Paquete	1
Pipeta de 10 μ l	Unidad	1
Puntas azules	Unidad	136
Puntas amarillas	Unidad	546
Puntas blancas	Unidad	138
Gradillas	Unidad	1
Equipo Lector de ELISA	Unidad	1
Viales	Unidad	150

3.5.4. Materiales químicos

Tabla 7. *Materiales químicos.*

Descripción	Unidad de medida	Cantidad
Agua destilada	ml	15.6
Solución de Parada (0.5 M)	ml	4
Solución de Revelación (TMB)	ml	4
Solución de Lavado concentrado (20X)	ml	18
Control positivo	μ l	190
Control negativo	μ l	110
Conjugado concentrado (10X)	ml	0.23
Diluyente 14	ml	2.5
Diluyente 12	ml	3.2
Microplacas sensibilizadas con extractopurificado de <i>Neospora caninum</i>	Tira	2

3.5.5. Materiales biológicos

Tabla 8. *Materiales biológicos.*

Descripción	Unidad de medida	Cantidad
Caninos	Kilogramos	112
Suero (Sangre)	ml	1.5
Pools	Unidad	5
Estudiante		1

3.6. Consideraciones éticas

En el capítulo III de la ordenanza para el Control y Manejo de la Fauna Urbana y la Protección Animal del GAD Municipal de Cuenca, describen algunos aspectos que hay que tomar en cuenta al realizar prácticas experimentales con animales domésticos de compañía.

Art. 43.- Está prohibida la experimentación que implique sufrimiento físico o distress del animal; debiendo utilizarse y desarrollarse alternativas técnicas, ceñidas a la Bioética.

Art. 44.- La Unidad de Gestión Animales (UGA), en coordinación con las universidades locales que cuenten con carreras de medicina humana, veterinaria y zootecnia, promoverán la creación de Comités de Bioética para controlar las prácticas experimentales con animales.

Art. 45.- Se prohíbe la experimentación de animales domésticos de compañía y fauna urbana en actividades y procesos industriales. (GAD Cantonal de Cuenca, 2016)

Estos aspectos nos ayudan a tener en cuenta que cada actividad que se realice y que involucre a los animales domésticos de compañía se deberá garantizar el bienestar animal en el que se incluyen las cinco libertades basadas en la ley utilitarista y deontológica.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Prevalencia de *Neospora caninum* en caninos.

El estudio fue enfocado a identificar la presencia de *Neospora caninum* mediante la técnica de ELISA Competitiva, donde se analizó un total de 112 muestras de suero sanguíneo de los cantones Paute y Santa Isabel. Al realizar los cálculos estadísticos obtuvimos los siguientes resultados:

Tabla 9. Cuadro estadístico de seroprevalencia de *Neospora caninum*.

Estado	Frecuencia	Prevalencia
Negativo	110	98.21%
Positivo	2	1.79 %
Dudoso	0	0%
Total	112	100%

Los resultados obtenidos negativo y positivo fueron confirmados mediante el Kit Id Screen ® *Neospora caninum Competition multi species* ELISA Kit que detecta anticuerpos de *ant-Neospora caninum*. Obteniendo 2/112 muestras positivas.

En la tabla 9 se detallaron los resultados de la densidad óptica y S/N Ratio que nos ayudó a determinar la prevalencia de Neosporosis en estos cantones.

4.2. Exposición de resultados de pools del cantón Paute y Santa Isabel.

Se preparó 12 pools de 112 muestras de suero canino; cada pool se formó con 100 µl de suero de cada individuo. Se formaron 6 pools con 10 muestras de suero y un pool con 8 muestras de suero del cantón Paute, código (E1 – C2); y 4 pools con 10 sueros y 1 pool con 4 muestras de suero sanguíneo del cantón Santa Isabel, código (D2 – H2).

Tabla 10. Resultado detallado ELISA Competitivo de pools del cantón Paute y Santa Isabel.

Referencias	Coordenadas	DO	S/N Ratio	Resultados
Control positivo	A1	0.171		
Control positivo	B1	0.151		
Control negativo	C1	1.264		
Control negativo	D1	1.364		
01	E1	1.245	94%	N
02	F1	1.323	100%	N
03	G1	1.477	112%	N
04	H1	1.186	90%	N
05	A2	1.267	96%	N
06	B2	0.902	68%	N
07	C2	1.140	86%	N
08	D2	1.309	99%	N
09	E2	0.724	55%	D
10	F2	0.743	56%	D
11	G2	1.208	91%	N
12	H2	0.913	69%	N

La seroprevalencia de anticuerpos para *Neospora caninum*, mediante la técnica de ELISA, del total de 112 muestras analizadas por pools, evidenció 10 pools negativas, que equivale a un 83.33% y 2 pools dudoso que equivale al 16.67%. Esto debido a que el S/N% de los códigos E2 y F2 se encuentran entre el $> 50\%$ y $<60\%$, no logrando alcanzar el valor para ser consideradas positivas por lo que se realizó un análisis de sueros individuales de los dos pools pertenecientes al Cantón Santa Isabel. En la tabla 10 se detalla los resultados obtenidos del análisis de sueros individuales.

4.3. Criterio de validación.

Para validar el examen se requiere el valor de la media de la DO control negativo sea mayor que 0.7, y la razón entre el valor medio de la DO_{CP} y el valor medio de la DO_{CN} sea menor que 0.3.

$$\text{Media DO}_{CP}: 0.171 + 0.151 = 0.161$$

$$\text{Media DO}_{CN} > 0.70: 1.264 + 1.364 = 1.319$$

$$\text{DO}_{CP} / \text{DO}_{CN} < 0.30: 0.12$$

Los resultados obtenidos nos ayudaron a validar el criterio del ensayo de ELISA.

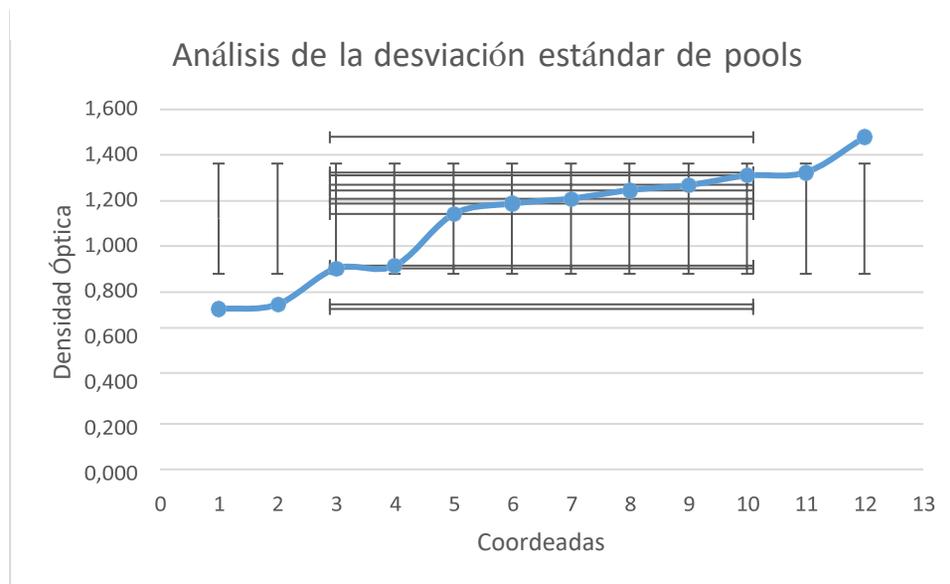
4.4. Análisis del comportamiento de la DO en pools.

Tabla 11. *Media, mediana, rango y desviación estandar*

Coordenadas	DO
E2	0.724
F2	0.743
B2	0.902
H2	0.913
C2	1.140
H1	1.186
G2	1.208
E1	1.245
A2	1.267
D2	1.309
F1	1.323
G1	1.477
Media	1.119
Mediana	1.197
Rango	0.724 – 1.477
Desviación estándar	0.241

Se realizó un análisis del comportamiento de la densidad óptica arrojada por el equipo lector de ELISA, los valores fueron ordenados de menor a mayor y se calculó valores como la media, mediana, rango y la desviación estándar para identificar valores atípicos.

Figura 3. Desviación estándar de pool.



La desviación estándar nos indica la dispersión de los datos con respecto a la media, no se observó un desnivel con mucha relevancia al analizar pools. Sin embargo las coordenadas 1 y 2 poseen densidades ópticas bajas y un S/N Ratio menor al 60%, considerándolo pools sospechosos y obligando a correr ensayos de sueros individuales de estos pools.

4.5. Análisis de resultados obtenidos de sueros individuales.

Tabla 12. *Resultado detallado ELISA Competitivo de análisis de sueros individuales del Cantón Santa Isabel.*

Referencias	Coordenadas	DO	S/N Ratio	Resultados
Control positivo	A1	0.147		
Control positivo	B1	0.150		
Control negativo	C1	1.068		
Control negativo	D1	1.162		
01	E1	1.040	93%	N
02	F1	0.943	85%	N
03	G1	0.953	85%	N
04	H1	1.018	91%	N
05	A2	0.393	35%	P
06	B2	1.038	93%	N
07	C2	0.902	81%	N
08	D2	1.039	93%	N
09	E2	0.739	66%	N
10	F2	0.999	90%	N
11	G2	1.024	92%	N
12	H2	0.847	76%	N
13	A3	1.099	99%	N
14	B3	0.897	80%	N
15	C3	1.016	91%	N
16	D3	1.059	95%	N
17	E3	0.893	80%	N
18	F3	1.065	96%	N
19	G3	1.097	98%	N
20	H3	0.283	25%	P

Al correr el ensayo de Elisa de los sueros individuales de los códigos E2 y F2 se obtuvo los resultados detallados en la tabla 10, se evidenció 18 muestras negativas equivalente al 90% y 2 muestras positivas equivalente al 10%. El S/N ratio de los códigos A2 y H3 se encuentran entre el 35% y 25% respectivamente y una densidad óptica baja, lo que los considera como muestras positivas.

4.6. Criterio de validación.

Se validó el ensayo teniendo en cuenta los criterios de validación recomendados para el análisis de pools.

$$\text{Media DO}_{\text{CP}}: 0.147 + 0.150 = 0.149$$

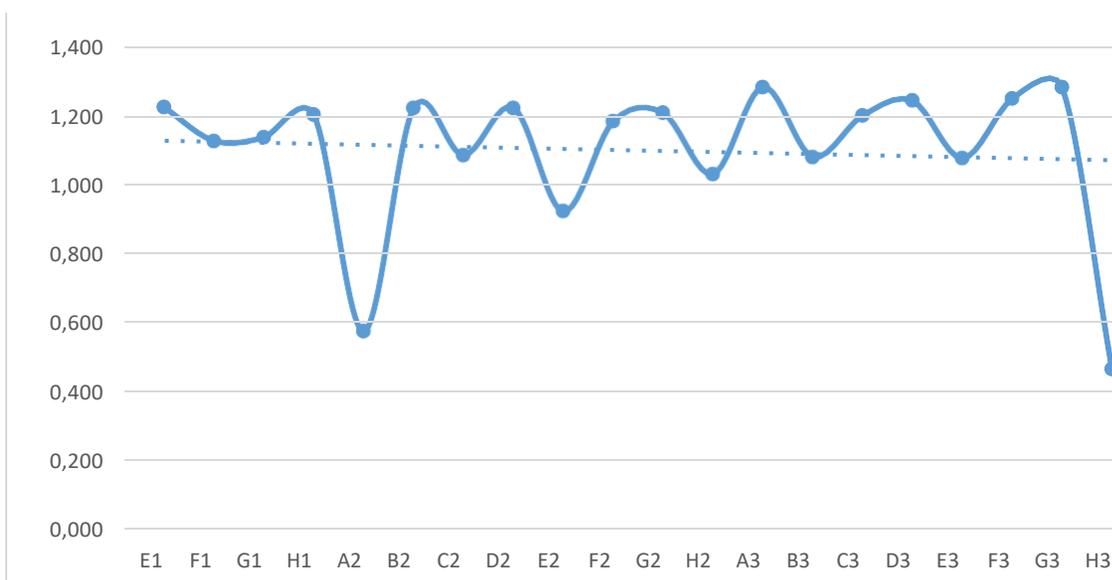
$$\text{Media DO}_{\text{CN}} > 0.70: 1.068 + 1.162 = 1.115$$

$$\text{DO}_{\text{CP}} / \text{DO}_{\text{CN}} < 0.30: 0.13$$

Criterio validado.

4.7. Análisis del comportamiento de la DO del ensayo de sueros individuales.

Figura 4. Análisis del comportamiento de la densidad óptica en sueros individuales



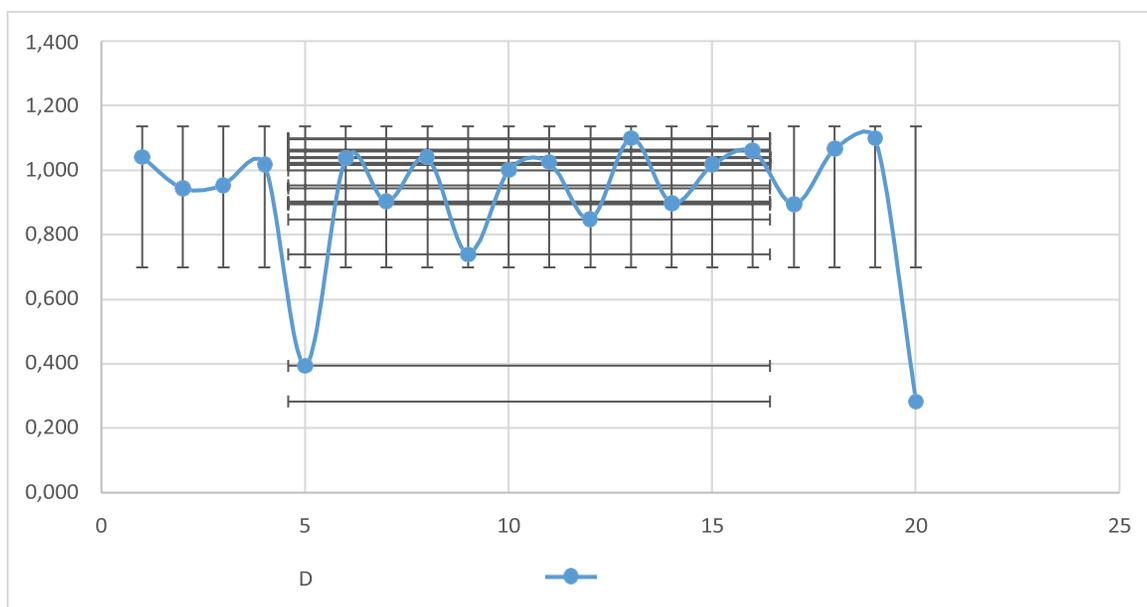
La gráfica se realizó con los datos en el orden que se dispuso en los pocillos al realizar el ensayo, se realizó una curva de tendencia para determinar el comportamiento de la densidad óptica. Los valores de los códigos A2 y H3 poseen densidades ópticas muy bajas, esto debido a la positividad de las muestras. Las muestras consideradas negativas no muestran desniveles con mucha relevancia por lo que no se muestra una variación de los datos de la curva de tendencia.

Tabla 13. *Cuadro resultado de análisis de muestras de Elisa.*

Coordenadas	DO
E1	1,040
F1	0,943
G1	0,953
H1	1,018
A2	0,393
B2	1,038
C2	0,902
D2	1,039
E2	0,739
F2	0,999
G2	1,024
H2	0,847
A3	1,099
B3	0,897
C3	1,016
D3	1,059
E3	0,893
F3	1,065
G3	1,097
H3	0,283
Media	0,917
Mediana	1,008
Rango Inferior	0,699
Rango Superior	1,136
Desviación Estándar	0,218

Se realizó también un análisis de este ensayo para determinar la dispersión de los datos con respecto a la media general. En este caso al tener muestras positivas se observó una desviación atípica de las coordenadas 5 y 20 mientras que las muestras consideradas negativas se encuentran más concentrados dentro de la media general establecida.

Figura 5. Desviación estándar de sueros individuales.

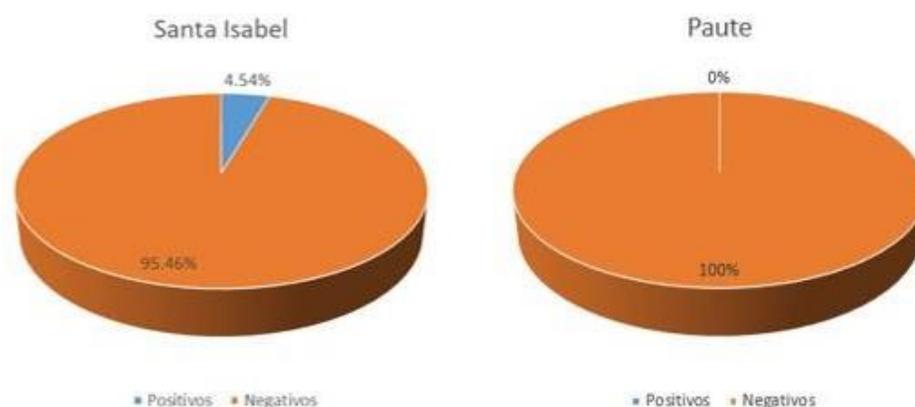


4.8. Prevalencia de *Neospora caninum* según los cantones.

Según el análisis de los resultados, nos indica que en el Cantón Santa Isabel presenta una prevalencia de 4.51% siendo el único cantón que presento casos positivos, mientras que en el cantón Paute no se registró ningún caso positivo aun siendo el cantón con mayor número de muestras analizadas.

Tabla 14. Prevalencia de *Neospora caninum* según los cantones.

Cantón	N	Positivos	Porcentaje (%)
Paute	68	0	0%
Santa Isabel	44	2	4.54%
Total	112	2	1.79%

Figura 6. Distribución de prevalencia de *Neospora caninum* según el cantón.

4.9. Discusión

En un estudio realizado en la Provincia de Pichincha por Recalde (2013), donde se analizó la presencia de *Neospora caninum* en perros que acudieron a dos clínicas veterinaria, determinó un 6% de seropositivo de un total de 100 muestras obtenidas. Este resultado es comparativamente alto con respecto a los resultados obtenidos en la investigación debido, a que en la presente investigación las muestras analizadas eran de caninos aparentemente sanos.

Oña (2015) realizó una investigación en el cantón Cayambe, acerca de la relación que tiene este parasito entre caninos y bovinos para su existencia. La investigación confirmó que existe un 62,14% de relación; dando positividad de un 65% en caninos y un 61% bovinos.

Investigaciones nacionales e internacionales han aportado estudios sobre determinar una técnica adecuada para detectar la presencia de este parásito. Así Barbecho (2018) realizó un análisis de sensibilidad y especificidad para este parásito utilizando dos métodos de diagnóstico: para ello realizó los métodos de diagnóstico de flotación y PCR en 100 caninos elegidos aleatoriamente. Obtuvo una incidencia de 6% por la técnica coproparasitario y un 1.06% por la técnica PCR, esto debido a la poca sensibilidad y especificidad de la técnica coproparasitario frente a la técnica PCR, por ello la importancia de tomar en cuenta una técnica adecuada para los análisis en la parasitología.

La investigación realizada por Ruiz et al (2012) quienes evaluaron muestras de caninos con y sin afecciones neuromusculares obtuvieron prevalencias de 5.2% para caninos con afecciones neuromusculares de 96 muestras y un 1.7% en caninos sin afecciones de 120 animales muestreados, como podemos observar al comparar este último resultado tenemos una relación aproximada con la presente investigación, al tener una baja prevalencia en animales sin signos para este parásito.

Comparado un estudio realizado en el departamento de Puno Lima por Vega et al. (2010) encontraron una prevalencia de 6.3% de 122 muestras de caninos, siendo relativamente alta al resultado obtenido en esta investigación. Las procedencias de los animales son de algunas áreas de producción ganadera por lo que se puede asumir que exista una mayor prevalencia por la relación de este parásito entre estas dos especies. Otro estudio que aporta esta relación es la investigación realizada por Bulla y Vanegas (2015) que identificó una prevalencia de 21,6% de un total de 60 muestras de caninos procedentes de 30 de hatos ganaderos.

La baja prevalencia en la investigación se asume que posiblemente sea por la procedencia de los caninos de las zonas urbanas a comparación de las investigaciones realizados en las zonas rurales sobre todo que estén en contacto con otras especies como los bovinos por la estrecha relación entre estas especies.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.10. Conclusión

La investigación se realizó con muestras de caninos aparentemente saludables, pese a ello la técnica de ELISA competitiva siendo un método de diagnóstico confiable y seguro detectó la presencia de anticuerpos de *Neospora caninum* en un 1,79% del total de 112 muestras analizadas. Estos resultados son similares a otras investigaciones realizadas en las mismas condiciones que la presente investigación.

El análisis de muestras mediante pools para detección de presencia o ausencia de la enfermedad fue seguro y eficiente debido a que al ser 10 sueros en un pool tuvo poca absorción óptica, pero lo suficiente para ser considerada dudosa por lo que se analizó individualmente los pools sospechosos y no todas las muestras.

La seroprevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* en caninos en el cantón Santa Isabel fue de 4.54%, es un porcentaje bajo si se tiene en cuenta los datos de seroprevalencia reportados en otras regiones del país; mientras que en el cantón Paute se obtuvo una seronegatividad de 100%, su baja o nula prevalencias se debe a que los animales muestreados son provenientes en su mayoría de las zonas urbanas y la poca interacción con otras especies disminuye la presencia de este parásito en los caninos. Por otro lado, se ha reportado investigaciones de hospederos reservorios como la paloma que puede introducir este parasito en zonas urbanas, por lo que es importante incluir como diagnóstico diferencial en animales con signos neurológicos.

4.11. Recomendación

Dado que en la investigación se encontró un bajo porcentaje de prevalencia se recomienda analizar muestras de animales provenientes de las zonas rurales, que tengan contacto con otras especies como ganado bovino, o caninos que posea alguna alteración neurológica.

Es importante tener en cuenta el método para el diagnóstico, por lo que se recomienda técnicas serológicas como la técnica de ELISA debido a que posee una alta sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos para *Neospora caninum*.

Ante cualquier enfermedad la prevención siempre será mejor que tratar con el problema, por lo que se recomienda evitar el contacto directo de caninos con los bovinos, consumo de fetos abortados, vísceras y carne cruda. Además, manejar un calendario de plan de desparasitación de los caninos y bovinos, sobre todo en las áreas rurales donde se mantiene una relación más estrecha entre estas especies.

5. BIBLIOGRAFÍA

- ALLSCIENCE. (19 de Abril de 2019). *All Science Ciencia, Tecnologia y Ambiente*. Obtenido de <https://www.e-allscience.com/blogs/news/elisa-que-es-en-que-consiste-cuales-son-los-distintos-tipos-de-este-ensayo-y-en-que-se-diferencian>
- Álvarez, D. (2016). *Neospora Caninum y sus alteraciones sobre la salud reproductiva bovina*. (Tesis pre-grado), Corporación Universitaria Lasallista, Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias, Caldas— Antioquia.
- Arranz, D. (2016). *Nuevos modelos animales para el estudio de la infección por "Neospora caninum" durante la gestación*. (Tesis doctoral), Universidas Complutense de Madrid, Departamento de Sanidad Animal, Madrid.
- Aycachi, R. (08 de 2005). Neospora caninum . Parasitología . Obtenido de Monografias.com: <https://www.monografias.com/trabajos30/neospora-caninum/neospora-caninum.shtml>.
- Barbecho, P. (2018). *“Diagnóstico molecular de la infección gastrointestinal de Neospora caninum en caninos*. (Tesis Maestria), Universidad de Cuenca, Faultadad de Ciencias Agropeuarias, Cuenca.
- Benavidez, K., Potosí, G., & Roque, L. (2016). Ooquistes y anticuerpos de Neospora caninum en perros de hatos seropositivos a neosporosis en Nariño . *Revista de Investigación Pecuaria*, 4(1), 51-54.
- Bjerkas, I., & Dubey, J. P. (1991). Evidence that Neospora caninum is identical to the Toxoplasma-like Parasite of Norwegian Dogs. *Acta Vet Scand.* , 32(3), 407-410.
- Blanco, R., Gómez, V., & Cardona, J. (2015). Neosporosis en animales domésticos: una revisión. *Journal of Agriculture & Animal Sciences*, 4(1), 64-73.
- Benavidez, K., Potosí, G., & Roque, L. (2016). Ooquistes y anticuerpos de Neospora caninum en perros de hatos seropositivos a neosporosis en Nariño . *Revista de Investigación*

Pecuaria, 4(1), 51-54.

Borries, V. (2016). *Estudio serológico de Neospora caninum y factores asociados a su exposición en perros urbanos y rurales de la zona sur de Chile*. (Tesis de Pregrado), Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.

Cornejo, M., Zorrilla, D., Bermúdez, N., & Estacio, J. (2010). *Dipecho vii "Implementación de la metodología de análisis de vulnerabilidades a nivel cantonal" Paute*. Paute.

De la Cerda, A. (2015). *Asociación entre la presencia de anticuerpos contra Toxoplasma gondii y Neospora caninum en perros con manifestaciones clínicas neurológicas y respiratorias*. (Tesis de Maestría), Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropeuarios, Aguascalientes.

Dubey, J. P., & Lindsay, D. S. (1996). A review of Neospora caninum and neosporosis. *Vet Parasitol*, 67(1-2), 1-59.

Dubey, J., & Lappin, M. (2008). Toxoplasmosis y neosporosis. En J. Dubey, & M. Lappin, *Enfermedades infecciosas del perro y el gato* (págs. 843-850). Buenos Aires - Argentina: Editorial Inter-Médic.

Dubey, J., Hemphill, A., Calero, R., & Schares, G. (2017). *Neosporosis in Animals*. Florida: Editorial CRC Press.

Dubey, J., Schares, G., & Ortega, L. (2007). Epidemiology and Control of Neospora caninum. *Clin Microbiol Rev*, 20(2), 323-367.

Escalona, J., Corro, A., Suárez, C., Castillo, T., & Pineda, Y. (2013). Seropositividad a Neospora caninum en perros de áreas rurales y urbanas del estado Yaracuy, Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias UCV*, 54(1), pp. 29-34. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/3731/373139081004.pdf>

- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites. (2013). *Control de Protozoos Intestinales en Perros y Gatos*. España: AVEPA. Obtenido de https://www.esccap.org/uploads/docs/3sbvfy71_ESCCAP_Guide_6_spanish_version_def.pdf
- GAD Cantonal de Cuenca. (2016). *Ordenanza para el Control y Manejo de la Fauna Urbano y la Protección de Animales Domésticos de Compañía del Cantón Cuenca*. Cuenca.
- GAD SANTA ISABEL. (s.f.). *GAD SANTA ISABEL - Ubicación Geográfica*. Obtenido de <http://santaisabel.gob.ec/santa-isabel/ubicacion-geografica/>
- Gómez, L., Atehortua, D., & Orrozco, S. (2007). La influencia de las mascotas en la vida humana. *Revista colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20(3), 377-386.
- Ibáñez, Y. (2007). *Situación actual de la respuesta inmune a "Neospora"*. (Tesis pregrado), Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", División General de Ciencia Animal, Torreón - México.
- López, G., Restrepo, B., Restrepo, M., Lotero, M., Murillo, V., Chica, A., . . . Giraldo, J. (2007). Estudio para evidenciar la presencia de *Neospora caninum* en bovinos de la hacienda San Pedro en el Municipio de Fredonia. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 2(1), 7-20.
- Lozada, E. (2004). *Determinación de la Presencia de anticuerpos de Neospora caninum en hatos lecheros de la Sierra Centro Norte del Ecuador, por prueba inmunoenzimática*. (Tesis Pregrado) , Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Quito - Ecuador.

- Martínez, R., León, V., & Álvarez, J. (2015). Neosporosis en animales domésticos: una revisión. *Journal of Agriculture & Animal Sciences*, 66
- Melo, L., & Peláez, J. (2012). *Reporte de caso: Neospora caninum en perro de raza Dogo argentino en la clinica veterinaria del poblado Medellin*. Obtenido de Slide Share: <https://es.slideshare.net/CLINICAVETERINARIAPOBLADO/reporte-de-caso-14240835>
- Moore, D., Venturini, M., & Campero, C. (2006). *Avances en la Neospora bovina*. Buenos Aires, Argentina . Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/29180/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Morey, D. (2014). The early evolution of the domestic dog. *American Scientist*, 82, 336–347.
- Naguleswaran, A., Cannas, A., Keller, N., Vonlaufen, N., Shares, G., Conraths, J., . . . Hemphill, A. (2001). Neospora caninum microneme protein NcMIC3: secretion, subcellular localization, and functional involvement in host cell interaction. *Infection and Immunity*, 69(10), 6483-6494.
- Oña, W. (2015). *Determinación de Neospora caninum en el Cantón Cayambe*. (Tesis grado), Universidad Central del Ecuador, Cayambe.
- Patitucci, A., R., M., Pérez, M., Rozas, M., & Israel, K. (2001). Neosporosis canina: presencia de anticuerpos sericos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. *Arch. med. vet.*, 32(2), 227-232.
- Pérez, F. (2004). *Variabilidad adaptativa y patogénica en "Neospora caninum"*. (Tesis Doctoral), Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Sanidad Animal, Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/5362/1/T27453.pdf>
- Pérez, J. (2019). *Neosporosis canina: la enfermedad y sus factores de riesgo*. (Tesis de Pregrado), Facultad de Ciencia Veterinarias, Tandil.

- Piaggio, J., Delucchi, L., Bañales, P., & Easton, C. (2007). *Actualización en Neosporosis*. Montevideo, Uruguay: Imprenta GEGA S.R.L.
- Recalde, D. (2013). *Determinación serológica de neospora caninum en pacientes caninos de dos clínicas veterinarias al norte de Quito*. (Tesis de Grado), Universidad de las Américas, Facultad de Ciencias de la Salud / Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Quito.
- REKOM BIOTECH. (2019). *Antígeno recombinante NcGRA7 para Neospora caninum*. Obtenido de REKOMVET: <https://www.rekombiotech.com/es/antigenos/animales/ncgra7>
- Roque, L., & Potosi, G. (2015). *Determinación de la presencia de ooquistes de Neospora caninum en material fecal de perros en 10 hatos lecheros serologicamente positivos a Neospora caninum en el Municipio de Pasto*. (Tesis de Grado), Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Pasto - Nariño.
- Ruíz, N., Casas, E., Suárez, F., & Fernández, V. (2012). Frecuencia de anticuerpos Neospora caninum y Toxoplasma gondii en canes con signos clínicos de afección neuromuscular. *Rev Inv Vet Perú*, 23(4), 441 - 447.
- SALUVET; Universidad Complutense Madrid. (s.f). *Parasitología Interactiva*. Universidad Complutense Madrid, Departamento de Salud; Facultad de Veterinaria, Madrid. Obtenido de <http://likesvirtual.es/saluvet/pages/presentacion.html>
- Sinnott, F. A., Monte, L. G., Collares, T. F., Silveira, R. M., & Borsuk, S. (2017). Review on the immunological and molecular diagnosis of neosporosis. *Veterinary Parasitology*, 239, 19-25.
- Vargas, J., & Cortés, J. (2001). Neospora caninum, ¿Una Zoonosis Potencial? *Rev. Salud Pública.*, 3(1), 89-93. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rsap/v3n1/v3n1a07.pdf>

Vega, L., Chávez, A., Falcón, N., Casas, E., & Puray, N. (2010). Prevalencia de *Neospora caninum* en perros pastores de una empresa ganadera de la sierra sur del Perú. *Rev. investig. vet. Perú*, 21(1), 80-86. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172010000100012

6. ANEXOS

6.1. Datos de formación de Pools

A. Tabla pools Paute (CP)

Pool 01	013	Pool 02	059	Pool 03	032	Pool 04	117
	027		066		082		069
	029		054		039		015
	035		073		025		067
	040		083		016		048
	041		086		033		037
	045		062		018		055
	047		099		049		063
	055		111		043		088
	056		081		109		097
Pool 05	091	Pool 06	028	Pool 07	031		
	020		107		094		
	070		022		074		
	108		001		061		
	106		121		096		
	042		101		024		
	026		046		023		
	068		113		009		
	103		021				
	098		087				

B. Tabla pools Santa Isabel (CS)

Pool 08	020	Pool 09	025	Pool 10	026	Pool 11	043	Pool 12	079
	027		061		074		011		058
	032		050		048		040		069
	037		019		023		010		039
	022		013		051		034		
	033		002		047		038		
	014		031		046		029		
	070		071		036		041		
	001		009		016		045		
	056		012		078		082		

6.2. Resultado ELISA del Equipo de ELISA pools

	1	2		1	2
A	+	pool 5	A	0.171	1.267
B	+	pool 6	B	0.151	0.902
C	-	pool 7	C	1.264	1.14
D	-	pool 8	D	1.374	1.309
E	pool 1	pool 9	E	1.245	0.724
F	pool 2	pool 10	F	1.323	0.743
G	pool 3	pool 11	G	1.477	1.206
H	pool 4	pool 12	H	1.186	0.913

6.3. Resultados cálculo de Elisa

	1	2
A	12.9643669	96.0576194
B	11.4480667	68.3851403
C	95.8301744	86.4291130
D	104.1698256	99.2418499
E	94.3896892	54.8900682
F	100.3032600	56.3305534
G	111.9787718	91.4329037
H	89.9166035	69.2191054

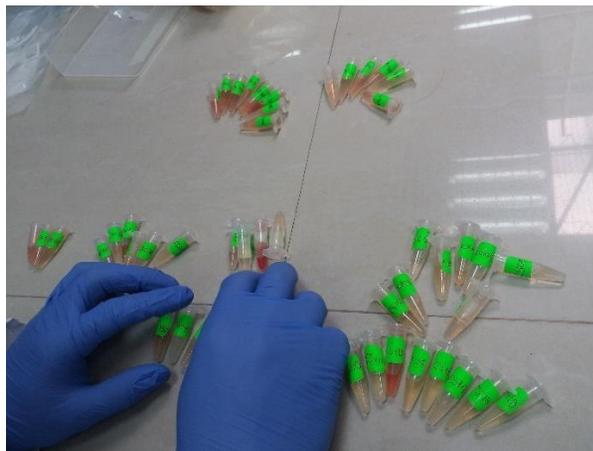
6.4. Análisis de sueros individuales de pools 9 y 10 del cantón Santa Isabel

	1	2	3		1	2	3
A	+	P 036	P 025	A	0.147	0.393	1.099
B	+	P 046	P 061	B	0.15	1.038	0.897
C	-	P 047	P 050	C	1.068	0.902	1.016
D	-	P 051	P 019	D	1.162	1.039	1.059
E	P 078	P 048	P 013	E	1.04	0.739	0.893
F	P 016	P 074	P 002	F	0.943	0.999	1.065
G	P 009	P 023	P 031	G	0.953	1.024	1.097
H	P 012	P 026	P 071	H	1.018	0.847	0.283

6.5. Resultado ELISA de sueros individuales

	1	2	3
A	13.1838565	35.2466368	98.5650224
B	13.4529148	93.0941704	80.4484305
C	95.7847534	80.896861	91.1210762
D	104.215247	93.1838565	94.9775785
E	93.2735426	66.2780269	80.0896861
F	84.573991	89.5964126	95.5156951
G	85.470852	91.838565	98.3856502
H	91.3004484	75.9641256	25.3811659

6.6. Imágenes de trabajo experimental



	1	2	3	4	5	6
A	0001 0.171	0009 1.382	0017 1.289	0025 1.289	0033 1.267	
B	0002 0.151	0010 1.358	0018 1.318	0026 1.255	0034 0.902	
C	0003 1.264	0011 1.314	0019 1.296	0027 1.442	0035 1.140	
D	0004 1.374	0012 1.301	0020 1.282	0028 1.135	0036 1.309	
E	0005 1.390	0013 1.332	0021 0.985	0029 1.245	0037 0.724	
F	0006 1.260	0014 1.284	0022 1.052	0030 1.323	0038 0.749	
G	0007 1.415	0015 1.497	0023 1.523	0031 1.477	0039 1.206	
	0008 1.170	0016 1.257	0024 1.239	0032 1.186	0040 0.913	

Send Result Print