

**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 NEOSPOROSIS (*Neospora caninum*) EN
CANINOS (*Canis lupus familiaris*) MEDIANTE EL MÉTODO DE
ELISA CUANTITATIVA”**

AUTORA:

MARÍA LUCINDA MAYANCELA SAETEROS

TUTOR:

DR. JUAN LEONARDO MASACHE MASACHE

CUENCA - ECUADOR

2022

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, María Lucinda Mayancela Saeteros con documento de identificación N° 0302692041, 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 NEOSPOROSIS (*Neospora caninum*) EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*) MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA CUANTITATIVA”**, mismo que ha sido desarrollado para optar 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, enero de 2022.



María Lucinda Mayancela Saeteros

C.I. 0302692041

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“PREVALENCIA DE NEOSPOROSIS (*Neospora caninum*) EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*) MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA CUANTITATIVA”**, realizado por María Lucinda Mayancela Saeteros, obteniendo el *Trabajo Experimental* que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, enero de 2022.



Juan Leonardo Masache Masache

C.I. 1103109003

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, María Lucinda Mayancela Saeteros con documento de identificación N° 0302692041, autora del trabajo de titulación: **“PREVALENCIA DE NEOSPOROSIS (*Neospora caninum*) EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*) MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA CUANTITATIVA”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, enero de 2022.



María Lucinda Mayancela Saeteros

C.I. 0302692041

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente y de manera especial a Dios, quien día a día me guía, me da la fuerza y ánimos para seguir con mis estudios y que desde el principio nunca me ha desamparado; a mi padres Antonio y Carmelina quienes con su ejemplo y sabiduría me han guiado, siendo el pilar más importante en toda mi vida estudiantil y universitaria; a mis hermanas, familia y todos mis tutores por compartir sus conocimientos y desearles con todo el cariño sus mayores éxitos en sus labores y sus actividades.

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a Dios por darme la vida, guiarme y ser mi fortaleza.

A mis padres, mis abuelos, mis tíos y toda mi familia por todo el apoyo durante todas las metas que me he propuesto y gracias a ellos las he cumplido.

A todos mis profesores y docentes quienes me han brindado una mano despejando todas mis dudas, compartiéndome sus enseñanzas y saberes durante toda mi vida estudiantil y universitaria.

A mi tutor el Dr. Juan Leonardo Masache Masache que desde el principio de esta investigación me ha guiado, apoyado y ayudado a gestionar cada una de las actividades que han sido indispensables para poder culminar con este trabajo.

A todas las personas que de una u otra manera han intervenido motivándome en diferentes etapas de mi vida, durante mi vida universitaria y en el proceso de elaboración de este tema de investigación.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| <i>RESUMEN</i> | 12 |
| <i>ABSTRACT</i> | 13 |
| <i>1. INTRODUCCIÓN:</i> | 14 |
| 1.1. Problema..... | 15 |
| 1.2. Delimitación | 15 |
| 1.2.1. Delimitación Temporal..... | 15 |
| 1.2.2. Delimitación Espacial..... | 15 |
| 1.2.3. Ubicación..... | 16 |
| 1.2.4. Delimitación Académica | 16 |
| 1.3. Explicación del problema | 17 |
| 1.4. Hipótesis | 17 |
| 1.4.1. Hipótesis alternativa | 17 |
| 1.4.2. Hipótesis nula | 17 |
| 1.5. Objetivos..... | 17 |
| 1.5.1. Objetivo general | 17 |
| 1.5.2. Objetivos específicos | 17 |
| <i>2. REVISION Y ANALISIS BIBLIOGRAFICO Y DOCUMENTAL</i> | 18 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.1. | Generalidades | 18 |
| 2.1.1. | El perro | 18 |
| 2.1.2. | El sistema inmune..... | 21 |
| 2.1.3. | Antígenos..... | 22 |
| 2.2. | Neosporosis (<i>Neospora caninum</i>) | 23 |
| 2.2.1. | El ciclo biológico de <i>Neospora caninum</i> (HIPRA, 2020):..... | 23 |
| 2.2.2. | Presentación clínica | 24 |
| 2.2.3. | Factores de riesgo | 25 |
| 2.2.4. | Diagnóstico:..... | 27 |
| 2.2.5. | Tratamiento..... | 27 |
| 2.2.6. | Infección en el hombre | 28 |
| 2.3. | Elisa | 28 |
| 2.3.1. | Tipos de ELISA | 28 |
| 2.4. | Fundamentación teórica del kit Id Screen Neospora Caninum Competitios (ID. Vet Innovative Diagnostics)..... | 33 |
| 2.4.1. | Información General..... | 33 |
| 2.4.2. | Descripción y Principio | 33 |
| 2.3.3. | Componentes del Kit | 34 |
| 2.3.4. | Materiales necesarios no incluidos | 35 |
| 2.3.5. | Precauciones de uso..... | 35 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS | 36 |
| 3.1. | Materiales | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.1.1. Biológicos:..... | 36 |
| 3.1.2. Físicos..... | 36 |
| 3.1.3. Químicos..... | 37 |
| 3.1.4. Materiales de Campo..... | 37 |
| 3.2. Metodología..... | 38 |
| 3.2.1. Selección y tamaño de la muestra..... | 38 |
| 3.2.2. Obtención y centrifugación de las muestras sanguíneas..... | 38 |
| 3.2.3. Almacenamiento y transporte de las muestras..... | 39 |
| 3.2.4. Preparación de las muestras..... | 39 |
| 2.3.5. Preparación de la solución de lavado..... | 39 |
| 2.3.6. Procedimiento del ensayo..... | 39 |
| 2.3.6.1. Incubación corta..... | 39 |
| 2.3.6.2. Incubación nocturna..... | 40 |
| 2.3.7. Para todos los procedimientos propuestos..... | 40 |
| 2.3.8. Validación..... | 41 |
| 2.3.9. Interpretación..... | 41 |
| 2.3.10. Organización de variables..... | 42 |
| 4. <i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> | 43 |
| 4.1. Resultados..... | 43 |
| 4.2. Discusión..... | 46 |
| 5. <i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i> | 48 |
| 5.1. Conclusiones..... | 48 |

| | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 5.2. Recomendaciones | 48 |
| 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | <i>¡Error! Marcador no definido.</i> |
| 7. ANEXOS | 55 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Taxonomía de los caninos | 20 |
| Tabla 2. Frecuencia de positividad a <i>N. caninum</i> en perros que viven en establos lecheros. (campo, 2003)..... | 26 |
| Tabla 3. Componentes del Kit de <i>Neospora caninum</i> | 34 |
| Tabla 4. Materiales biológicos..... | 36 |
| Tabla 5. Materiales de Laboratorio..... | 36 |
| Tabla 6. Materiales de oficina. | 37 |
| Tabla 7. Soluciones químicas. | 37 |
| Tabla 8. Materiales para campo..... | 37 |
| Tabla 9. Tabla de valores de interpretación de resultados..... | 41 |
| Tabla 10. Variables independientes (Animales)..... | 42 |
| Tabla 11. Variables dependientes (Evaluación sanguínea) | 42 |
| Tabla 12. Resultados Interpretadas con la fórmula de Elisa cuantitativa..... | 43 |
| Tabla 13. Porcentajes de los resultados de las muestras analizadas. | 44 |
| Tabla 14. Resultados de casos dudosos o positivos a <i>N. caninum</i> encontrados de acuerdo con el sexo. | 45 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa satelital de Chorocopte (Maps, 2021) | 16 |
| Figura 2. Tipos de anticuerpos (Plus, 2020)..... | 22 |
| Figura 3. Ciclo de vida de <i>N. caninum</i> (Sykes, 2014)..... | 24 |
| Figura 4. Representación gráfica de los porcentajes encontrados con la prueba de Elisa cuantitativa..... | 44 |
| Figura 5. Resultados de casos positivos a <i>N. caninum</i> encontrados de acuerdo con el sexo. | 45 |
| Figura 6. Kit de <i>Nesopora caninum</i> | 55 |
| Figura 7. Instrucciones e indicaciones del Kit..... | 55 |
| Figura 8. Toma de muestra..... | 55 |
| Figura 9. Puntas amarillas | 55 |
| Figura 10. Probeta con agua destilada. | 56 |
| Figura 11. Vaso de precipitado..... | 56 |
| Figura 12. Muestras serológicas | 56 |
| Figura 13. Calibración de pipetas. | 56 |
| Figura 14. Inicio de proceso Pipeteado. | 57 |
| Figura 15. Añadición de medio de contraste. | 57 |
| Figura 16. Lavado de cultivo..... | 57 |
| Figura 17. Placa lista para lector de ELISA | 57 |

Figura 18. Lector de ELISA 58

RESUMEN

La neosporosis canina es una enfermedad protozoaria cuyos hospederos definitivos son los perros. Provoca grandes pérdidas económicas debido a que es de distribución mundial, se produce enfermedades en bovinos a nivel reproductivo debido a que los caninos se mantienen en contacto con estos animales produciéndose abortos, fetos débiles, etc. La transmisión se produce por consumo de fetos abortados, placentas contaminadas, transmisión vertical de madre a feto. En los animales afectados se observan resultados dependiendo de varios factores como son la edad afecta tanto a jóvenes como adultos, aunque se han reportado mayor número de casos en animales adultos; en el sexo afecta tanto a machos como a hembras; según la gestación las hembras con infección latente puede que desarrollen la enfermedad y el parásito llegue a través de la placenta al útero; según el hábitat los perros que viven en zonas rurales en contacto con bovinos presentan mayor exposición en relación a las que habitan en zonas rurales. El presente trabajo investigativo experimental se realizó con muestras serológicas tomadas en caninos de la parroquia Chorocopte, provincia del Cañar, donde es una zona de explotación ganadera bastante alta. Las muestras son analizadas mediante un Kit de Elisa cuantitativa frente a *Neospora caninum* de 188 (100%) muestras en total, obteniendo los siguientes resultados: 8 animales sospechosos o positivos que representan el 4,25%, 180 animales negativos que serían el 95,74%. Según el sexo de los animales muestreados, del total de 8 casos dudosos o positivos, 6 (75%) fueron hembras y 2 (25%) machos.

Palabras clave: ELISA, bovinos, Neosporosis canina..

ABSTRACT

Canine neosporosis is a protozoal disease whose definitive hosts are dogs. It causes great economic losses due to its worldwide distribution; it produces diseases in bovines at the reproductive level due to the fact that the canines remain in contact with these animals, causing abortions, weak fetuses, etc. Transmission occurs through consumption of aborted fetuses, contaminated placentas, vertical transmission from mother to fetus. In affected animals results are observed depending on various factors such as age affects both young and adults, although a greater number of cases have been reported in adult animals; in sex it affects both males and females; depending on the pregnancy, females with latent infection may develop the disease and the parasite reaches the uterus through the placenta; according to the habitat, dogs that live in rural areas in contact with bovines present greater exposure in relation to those that live in rural areas. The present experimental research work was carried out with serological samples taken from canines from the Chorocopte parish, Cañar province, where it is a fairly high livestock exploitation area. The samples are analyzed by Quantitative Elisa Kit against *Neospora caninum* of 188 (100%) samples in total, obtaining the following results: 8 suspect animals that represent 4.25%, 180 negative animals that would be 95.74% and no positive case is presented. According to the sex of the sampled animals, of the total of 8 doubtful cases, 6 (75%) were female and 2 (25%) were male animal samples.

Key words: ELISA, cattle, *Neospora caninum*.

1. INTRODUCCIÓN:

La neosporosis bovina en general es una enfermedad protozoaria, que se caracteriza por ser de carácter reproductiva siendo abortigénica, de importancia mundial. En las terneras recién nacidas presentan signos clínicos de ataxia neuromuscular y contractura articular y en las hembras gestantes, muerte fetal acompañada de retención placentaria y/o aborto. Signos clínicos semejantes han sido descritos en otros rumiantes como la cabra y la oveja, aunque muy esporádicamente (Cordero del Campillo, 2000, págs. 363-368; Bulla Blanco, 2015).

La aparición de la *N. caninum* se relata desde 1984 por Bjerkas, en Noruega, en cachorros que presentaban alteraciones neuromusculares; en esa ocasión fue considerado como *T. gondii*, aunque el estudio serológico no fue positivo para este agente. Posteriormente, tejidos de perros con diagnóstico presuntivo de toxoplasmosis fueron estudiados por Dubey en 1988 donde observaron la presencia de un parásito diferente a *T. gondii*, describiendo el nuevo género como *Neospora* y la especie *caninum*. También en 1984 Dubey y col, elaboraron la inmunofluorescencia indirecta como primera prueba para diagnóstico serológico de *N. caninum*. Igualmente, Thilsted y Dubey en 1989, reportaron por primera vez la presencia de organismos semejantes al *N. caninum* en cerebros de fetos bovinos abortados de un rebaño lechero en Nuevo México, el cual presentaba abortos frecuentes.

Ha sido citada como agente productor de una encefalomiелitis congénita y ataxia locomotora en los cachorros. Tiene como hospedadores intermediarios a animales domésticos y salvajes, felinos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos, ciervos y equinos y como hospedador definitivo el perro (Campero, 2002). La *N. caninum* es la causa más importante

de abortos en bovinos provocando un alto impacto económico por su gran prevalencia (Gottstein, 2002) .

La parroquia Chorocopte es una zona ganadera con alta demanda en producción láctea donde los caninos pueden verse afectados debida al contacto con la que se mantienen en las haciendas sirviendo como guardianes, pudiéndose presentarse enfermedades como son la *Brucella abortus*, *Neospora caninum*, etc.

1.1.Problema

La *Neospora caninum* es un protozooario específico de la especie canina presentando síntomas como encefalomiелitis y en bovinos se reportan casos de abortos.

La presente investigación se realizó con la finalidad de determinar la prevalencia de la Neosporosis en los caninos para lo cual se utilizó muestras serológicas tomadas de caninos que habitan en haciendas de la parroquia Chorocopte, provincia del Cañar, realizando pruebas de ELISA cuantitativa para su determinación debido a que no existen estudios previos a pesar del contacto que mantienen los caninos con los bovinos.

1.2.Delimitación

1.2.1. Delimitación Temporal.

El presente trabajo tuvo una duración de 400 horas distribuidas en trabajo de campo, laboratorial y redacción del documento final.

1.2.2. Delimitación Espacial.

El presente trabajo investigativo descriptiva experimental se realizó en el laboratorio de la Clínica Veterinaria "POLIVET" en la Universidad Politécnica Salesiana, realizando las pruebas respectivas de ELISA cuantitativa en los 188 sueros de las muestras sanguíneas

caninas tomadas de las diferentes haciendas en la parroquia Chorocopte perteneciente al Cantón Cañar.

1.2.3. Ubicación

La parroquia Chorocopte se encuentra en la cordillera oriental de los Andes, presenta un relieve irregular, con la presencia de numerosos valles, lagunas y hondonadas. Se encuentra a 3.370 msnm, y una temperatura de 4°C - 18°C, pero la temperatura promedio de la parroquia es de 11°C. Además, cuenta con una superficie de 5217 hectáreas, la misma que está dividida en 13 unidades espaciales que conforman la parroquia: La Capilla, Romerillo Bajo, Tomaloma, Treton, Milmilpamba, Ganzhi, Citacar, Lluillán, Los Encaladas, Romerillo Alto, Zhadan pugro, Curiurcu, Centro Parroquial, y Área Comunal (tiempo, 2020).

MAPA SATELITAL DE CHOROCOPTTE (Maps, 2021)



Figura 1. Mapa satelital de Chorocopte (Maps, 2021)

1.2.4. Delimitación Académica

El presente trabajo investigativo experimental fue desarrollado dentro del área de Laboratorio Clínico, de esta forma se establecen resultados para proseguir con nuevos estudios y diagnósticos precisos ayudándonos a enriquecer nuestros conocimientos adquiridos durante toda nuestra formación profesional.

1.3. Explicación del problema

La neosporosis canina tiene como hospedador definitivo al perro, siendo este un animal que en el campo ganadero se mantiene en contacto con los bovinos, pudiéndose este transmitirse y presentarse síntomas diagnosticadas en estudios previos como son los abortos, encefalomiелitis en los terneros.

Con este estudio se pretende establecer la prevalencia de la neosporosis en caninos que conviven con bovinos en haciendas pertenecientes a la parroquia Chorocopte, provincia del Cañar.

1.4. Hipótesis

1.4.1. Hipótesis alternativa

- Ha: La prevalencia de *Neospora caninum* en caninos, en parroquia Chorocopte, provincia del Cañar es alta.

1.4.2. Hipótesis nula

- Ho: La prevalencia de *Neospora caninum* en caninos, en parroquia Chorocopte, provincia del Cañar es baja.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Diagnosticar la presencia de *Neospora caninum* en perros mediante la prueba de ELISA cuantitativa en la parroquia Chorocopte perteneciente al Cantón Cañar.

1.5.2. Objetivos específicos

- Realizar la prueba de ELISA cuantitativa en 188 sueros sanguíneos de caninos machos y hembras para detectar *Neospora caninum*.

- Determinar la prevalencia de *Neospora caninum* y su impacto en los hatos lecheros.

2. REVISION Y ANALISIS BIBLIOGRAFICO Y DOCUMENTAL

2.1. Generalidades

2.1.1. El perro

2.1.1.1. Origen

Según (Ripoll, 2006, págs. 2-3), a lo largo de los años, se han propuesto diferentes teorías acerca de origen del perro como animal doméstico, haciéndolo provenir de cruces entre distintos cánidos silvestres. El prestigiado etólogo Konrad Lorenz, suponía que los perros debido a sus marcadas diferencias morfológicas y conductuales provenían por un lado del chacal dorado y por otro del lobo. En 1997 en la prestigiosa revista SCIENCE, se publicó un trabajo que confirma definitivamente que "todas las razas de perros actuales tienen una sola especie ancestral: el Lobo. El estudio se basa en la determinación del ADN de unas 70 razas de perros, comparándolo con el de lobos y otros cánidos como coyotes y chacales de distintas especies, existiendo una gran similitud entre los primeros (perros y lobos) y grandes diferencias con chacales o coyotes. Representado un 99,8% el parecido genético entre el perro y el lobo.

Según (Aguilar, 2017), el perro fue evolucionando en claro paralelismo a la evolución del hombre y por ello existen cuatro puntos de partida de las razas actuales a partir de lobos característicos de las cuatro primeras civilizaciones:

- El *Canis lupus arabs* acompañó a la civilización del Este del Mediterráneo y dio lugar a los actuales perros pastores, a los lebreles, a los molosos y a los de caza de olfato.

- El *Canis lupus pallipes* fue el fiel compañero de la civilización del valle del Indo. Fue el antepasado directo del dingo y de las razas indias y del sudeste asiático.
- El *Canis lupus chanco* fue el animal característico de la civilización del valle del Huang Ho (río Amarillo) y dio lugar a la mayoría de los perros orientales.
- El *Canis lupus lycaon* acompañó a la reciente civilización de las tribus nórdicas y dio lugar, como es de imaginar, a las actuales razas nórdicas.

Una nueva investigación genética apunta que fueron los cazadores recolectores europeos los primeros en domesticar a los lobos y no agricultores de Oriente Medio (Jorge, 2013).

2.1.1.2. La alimentación

Los perros necesitan una alimentación distinta a la de los humanos. Además, hay que tener en cuenta diversos aspectos a la hora de diseñar la composición de un plan de alimentación. El perro debe recibir todas las sustancias nutritivas, la comida debe ser lo más saludable y al gusto del animal. En primera instancia se recomienda administrar alimento que le daban en su antiguo hogar (Armadans, 2013).

2.1.1.3.Descripción de la especie

- ❖ La taxonomía de los perros es (Garcia, 2019):

Tabla 1. *Taxonomía de los caninos*

| Denominación | Descripción |
|--------------|-------------------------------|
| Dominio | Eukarya |
| Reino | Animalia |
| Subreino | Eumetazoa |
| Subfilo | Vertebrata |
| Clase | Mammalia |
| Subclase | Theria |
| Infraclase | Placentalia |
| Orden | Carnívora |
| Suborden | Caniformia |
| Familia | Canidae |
| Subfamilia | Caninae |
| Género | Canis |
| Especie | Canis lupus |
| Subespecie: | <i>Canis lupus familiaris</i> |

2.1.1.4.Características físicas de los perros

El perro es un mamífero cuadrúpedo que destaca por poseer rabo y un manto que cubre todo su cuerpo. Es un animal vivíparo y acerca del hábitat viven en ciudades y poblaciones rurales. La conducta social del perro según la sociobiología revela que los perros

son animales gregarios, es decir, que viven en comunidades formadas por varios individuos (García, 2019, pág. 4).

2.1.1.5. Formas de Transmisión

Además del contacto con agua o con restos contaminados, las hembras pueden contagiar directamente a sus cachorros. No se sabe con exactitud cómo se produce esta transmisión. La enfermedad en los perros así contagiados se manifiesta con mayor gravedad (Bestieros, 2019, págs. 6,7).

2.1.2. El sistema inmune

El sistema inmune está constituido por dos sistemas celulares que implica a los linfocitos que son producidos por los órganos linfáticos primarios (medula ósea y timo) y secundarios (nódulos linfáticos y bazo). Producen dos tipos de respuesta inmune: humoral (medula ósea dependientes) y celular (timos dependientes) (Jiménez, 2001, págs. 5-12).

Según (Oswaldo E. Vale Echeto, 2002, págs. 2,3), la respuesta humoral mediada por IgG depende fundamentalmente a la producción de linfocitos B, mientras que la mediada por IgM depende de los linfocitos T y macrófagos. La IgA, sintetizada por los plásmidos ha sido considerada como la Ig secretora que confiere inmunidad pasiva a través del calostro. La IgM se encuentra incrementada en situaciones inmunológicas inespecíficas, se encuentra en un 13% del total de Igs del suero sanguíneo.

Los cachorros nacen con solo un 5% de las inmunoglobulinas y llegan al 95% gracias al calostro de la madre. Tras el parto las inmunoglobulinas tienen capacidad de traspasar la pared intestinal solamente las primeras 24 horas. La inmunidad protege al cachorro durante 1-2 meses, periodo en el cual va disminuyendo los anticuerpos maternos en la sangre del cachorro, empezándose la producción propia (Lerner, 2020, pág. 2).

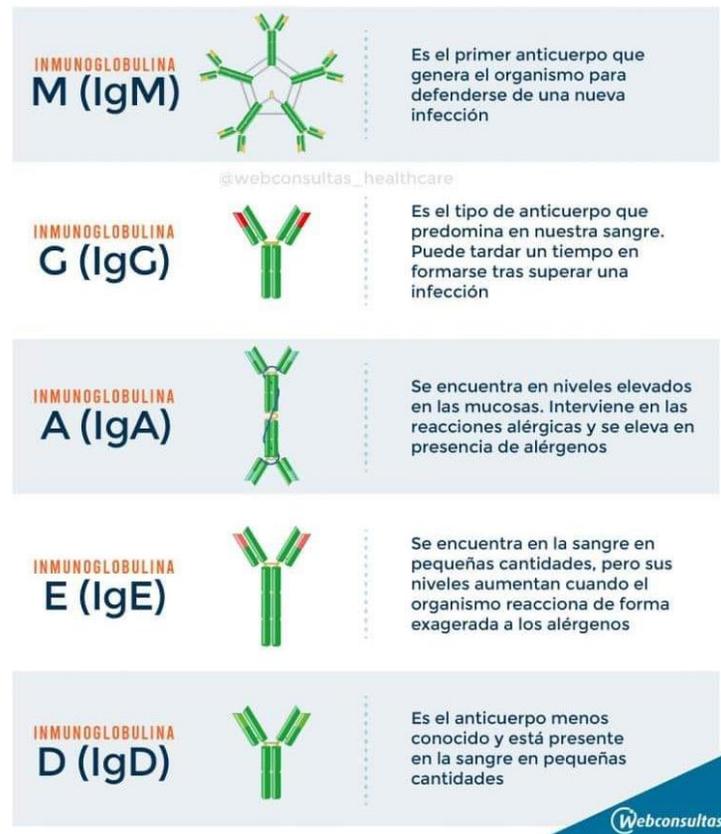


Figura 2. Tipos de anticuerpos (Plus, 2020)

2.1.3. Antígenos

Según (Jiménez, 2001, págs. 12,13), son glicoproteínas, encontradas en la superficie de los linfocitos maduros. Por medio de recombinaciones somáticas, mutaciones y otros mecanismos se generan más de 10 sitios de unión diferentes, y la especificidad antigénica se mantiene mediante procesos que aseguran que cada célula sintetice en su interior un único tipo de receptor. La especificidad de la respuesta inmune está controlada por un mecanismo

sencillo una célula reconoce un antígeno ya que todos los receptores antigénicos de un linfocito sencillo son idénticos.

2.2. Neosporosis (*Neospora caninum*)

La neosporosis canina es una enfermedad parasitaria causada por un protozoo. Puede afectar a varias especies animales, aunque, sobre todo, se conocen casos en bovinos y perros, especialmente cachorros. El cuadro clínico que provoca suele tener como protagonista una sintomatología similar a los de la toxoplasmosis canina, signos musculares y neurológicos (Besteiros, 2019, págs. 1,2)

Neospora caninum es un Coccidio que afecta principalmente caninos y bovinos. La neosporosis fue inicialmente descrita en caninos y posteriormente se postuló como causa de aborto epidémico en bovinos de leche a finales de los años 80, en Nuevo México. No obstante, sólo en 1989 se reconoció la enfermedad en los bovinos y su diseminación mundial. La neosporosis bovina se caracteriza por ser típicamente asintomática y de transmisión congénita por lo que las hembras infectadas perpetúan el parasitismo de generación en generación, en las explotaciones ganaderas. En los casos en donde se presenta sintomatología clínica la principal manifestación es el aborto con las consecuentes pérdidas económicas por la reducción en la producción de leche, la muerte de neonatos y la pérdida de animales adultos (Vargas J. C., 2001, pág. 1).

2.2.1. El ciclo biológico de *Neospora caninum* (HIPRA, 2020):

En perros y bóvidos son hospedadores intermediarios, en los que se produce una reproducción asexual bajo la forma de taquizoítos, que se encuentran dentro de múltiples células, y de bradizoítos, que se encuentran en los quistes intracelulares en tejido nervioso. Otra fase se produce en el perro, que es además el hospedador definitivo, en el cual después

de la ingestión de carne bovina cruda (quistes tisulares) se produce una reproducción sexual en su tracto digestivo, excretando gran cantidad de ooquistes no esporulados al medio con las heces. Una tercera fase se produce en el medio exterior, donde, una vez excretados los quistes, van a esporular dentro de las 24 horas siguientes. La resistencia al medio de dichos ooquistes aún no se conoce en la actualidad.

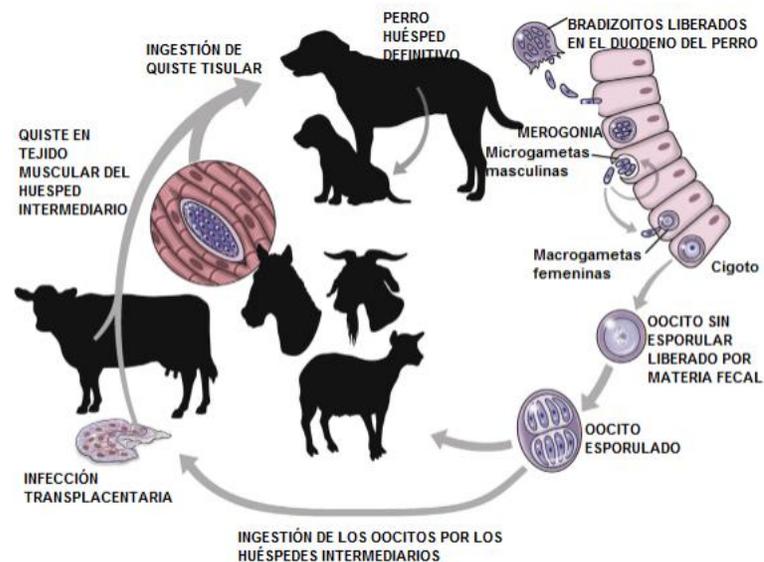


Figura 3. Ciclo de vida de *N. caninum* (Sykes, 2014).

2.2.2. Presentación clínica

Según estudios realizados se ha podido informar que existe un mayor porcentaje de animales que padecen de neosporosis de forma subclínica en comparación a los que manifiestan signos (Dubey, Hemphill, Calero Bernal, & Schares, 2017). El desarrollo clínico de la enfermedad (tipo de signos y progresión) van a depender de la virulencia de *N. caninum*, de la edad e inmunocompetencia del hospedador (Sykes, 2014). La neosporosis es más frecuente en perros jóvenes, en los muy viejos y en los inmunosuprimidos (Dubey, Hemphill, Calero Bernal, & Schares, 2017). Si bien la enfermedad se puede desarrollar a cualquier edad (Dubey & Lappin, 2008, págs. 843-850), la forma congénita es la más común y la signología

clínica aparece después del nacimiento o luego de unas pocas semanas (Troxel, 2009, págs. 24: 209-220).

Existen estudios experimentales que dan a conocer que *N. caninum* puede causar muerte fetal temprana, momificación, reabsorción y/o el nacimiento de cachorros débiles (Dubey & Lappin, 2008). Por otra parte, los animales adultos manifiestan la enfermedad después de la reactivación de infecciones crónicas (Troxel, 2009).

2.2.3. Factores de riesgo

Según (Pérez López, Giangreco, & Guerrero, 2019); hasta la actualidad se han dado a conocer múltiples factores que influyen en la prevalencia de la neosporosis canina, que son de importancia a la hora de realizar la anamnesis y además para poder aplicar medidas de control y prevención de la enfermedad.

Entre ellos se mencionan los siguientes:

- Edad: esta parasitosis afecta tanto a perros jóvenes como adultos. Aunque se han reportado un mayor número de casos en animales adultos, sugiriendo una infección postnatal dada por el tipo de alimentación o el lugar donde habitan, los casos más graves de *N. caninum* se dan en cachorros infectados congénitamente (Dubey & Lappin, 2008). Es de importancia mencionar que los perros adultos liberan una menor cantidad de ooquistes al ambiente en relación con los cachorros (Silva & Manchado, 2016, págs. 7:59-70).

(campo, 2003, págs. 145-149) en su estudio realizó un trabajo donde el objetivo fue medir la seroprevalencia de *N. caninum* en perros de establecimientos lecheros ubicados en el Valle de Lima (Perú); evaluaron diferentes variables, entre ellas si existía asociación estadística con la edad. En tal estudio el total de animales muestreados fue de 104 y dividió la variable

en animales menores a 1 año, entre 1-7 años y mayores a los 7 años. La diferencia entre ellos no fue significativa, demostrando que la edad no es un factor de riesgo.

Tabla 2. *Frecuencia de positividad a N. caninum en perros que viven en establos lecheros.*

(campo, 2003)

| Lugar | Animales (n) | | Frecuencia |
|-------------------|--------------|-----------|-------------------|
| | Muestreados | Positivos | % |
| Zona | | | |
| Huanura- Huarunal | 12 | 10 | 58.8 |
| Lima Norte | 32 | 8 | 25.0 |
| Lima Sur | 33 | 9 | 27.3 |
| Cañete | 22 | 7 | 31.8 |
| Edad | | | |
| <1 año | 16 | 4 | 25.0 |
| 1-7 años | 78 | 25 | 32.1 |
| >7 años | 10 | 5 | 50.0 |
| Sexo | | | |
| Macho | 58 | 21 | 36.2 |
| Hembra | 46 | 13 | 28.3 |
| Total: | 104 | 34 | 32.7 ± 9.0 |

2.2.4. Diagnóstico:

- Diagnóstico fetal: Histología: la lesión de cerebro es patognomónica. Inmunohistoquímica (cerebro, corazón, hígado, pulmón), en desuso. Serología fetal de fluido corporal. PCR.
- Serología: suero, leche (HIPRA, 2020)

2.2.5. Tratamiento

A pesar de la mejoría clínica, los tratamientos no eliminan la infección por *N. caninum* del organismo (Dubey, Hemphill, Calero Bernal, & Schares, 2017). El uso de clindamicina, sulfadiazina y pirimetamina, solas o en combinación ha sido hasta el momento, una de las opciones para la terapia de neosporosis (Dubey & Lappin, 2008); (Sykes, 2014); (Dubey, Hemphill, Calero Bernal, & Schares, 2017). La clindamicina no actúa contra los bradizoítos, pero sí es eficaz en evitar la reproducción y diseminación de los taquizoítos (Dubey & Lappin, 2008). Se puede administrar vía parenteral o vía oral a una dosis de 7,5 a 22 mg/kg y es la droga de elección para tratar la neosporosis clínica en perros (Gomez & Guida, 2010, págs. 285-289). Por otra parte, la combinación de trimetoprima y sulfadiazina a una dosis combinada de 15 mg/kg dos veces al día y pirimetamina 1 mg/kg diariamente durante cuatro semanas fue un éxito en aquellos perros que presentaron parálisis asociada a *N. caninum*. Otra combinación efectiva es clindamicina 10 mg/kg, tres veces al día y trimetoprima más sulfonamida 15 mg/kg, dos veces al día. La duración del tratamiento se extiende de 4 a 8 semanas (Dubey & Lappin, 2008).

2.2.6. Infección en el hombre

En el caso del hombre, no se ha reportado infección por *neospora caninum*, sin embargo, es posible que algunos casos hayan sido diagnosticados en forma errónea como infecciones por *toxoplasma gondii*. Existen reportes sobre la exposición de humanos a *neospora caninum* por inmunofluorescencia indirecta; sin embargo, se requieren mayores ensayos para determinar el significado de la exposición y las posibles reacciones cruzadas que pueden afectar estas respuestas (Vargas & Cortes, 2021, pág. 4).

2.3. Elisa

2.3.1. Tipos de ELISA

2.3.1.1. ELISA directo

“El ELISA directo es el ensayo ELISA más simple y rápido de todos, donde un anticuerpo primario marcado con una enzima se unirá directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y/o cuantificación de este” (Abintek, 2021, pág. 5)

“Permite la detección de antígenos específicos en una muestra. Es poco utilizado en el laboratorio clínico porque ha sido superado por ELISA de sándwich. En esta prueba se agrega la muestra del paciente directamente al soporte y permite que el antígeno buscado, si está presente en la muestra, se adsorba a dicho soporte.” (Yuil, 2012, pág. 10)

Según (Raquel, 2015, pág. 18) y (Abintek, 2021, pág. 6) el procedimiento simplificado sería el siguiente:

1. El antígeno se inmoviliza sobre una placa.
2. Se añade un anticuerpo primario marcado con una enzima que se unirá al antígeno de interés.

3. Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.

2.3.1.2. ELISA indirecto

“Es un ensayo parecido al ELISA directo, pero en dos pasos, lo que permite amplificar la señal obtenida. En este caso se utilizan dos anticuerpos, uno primario y otro secundario, y es este último el que irá conjugado a una enzima” (Abintek, 2021, pág. 5)

“Favorece la detección de anticuerpos. En esta prueba, el soporte tiene unido el antígeno específico contra el que va dirigido el anticuerpo que se está buscando en la muestra” (Yuil, 2012, pág. 10)

“En el cual los antígenos capturan a los anticuerpos y la reacción se evidencia por el conjugado anti- inmunoglobulina enzima, o proteína A-enzima. La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de anticuerpos en el suero y puede ser medida por la degradación de su sustrato. No obstante, debe tenerse en cuenta que su correlación con los ensayos in vivo se afecta cuando la concentración de anticuerpos es baja, ya que el ELISA indirecto tiende a sobrestimar los sueros de bajos títulos, probablemente esto se deba a la presencia de inmunoglobulinas inespecíficas o anticuerpos de baja afinidad” (Azze, 2012, pág. 182)

El procedimiento simplificado sería el siguiente:

1. El antígeno se inmoviliza sobre una placa.
2. Se añade un anticuerpo primario sin marcar que se une al antígeno de interés.
3. Se añade un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario
4. Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.

2.3.1.3. ELISA tipo sándwich

“En el ELISA tipo sándwich el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección también conocidos como pares de anticuerpos, que se unirán a dos epítomos distintos de un mismo antígeno” (Abintek, 2021, pág. 5).

“Ésta es la forma más utilizada para la detección de antígenos. En esta prueba, el soporte tiene unido un anticuerpo específico contra el antígeno que se está buscando en la muestra. En el primer paso, se agrega la muestra del paciente y, si el antígeno está presente, se unirá al anticuerpo que estaba adherido al soporte. Luego se hace un lavado para eliminar todo lo que no se haya unido al anticuerpo” (Yuil, 2012, pág. 10).

“Es el ejemplo clásico de métodos para la detección de antígenos, el primer anticuerpo captura el antígeno de la muestra que es detectado a través del conjugado anticuerpo-enzima o amplificado con un conjugado dirigido contra el segundo anticuerpo (sándwich doble anticuerpo modificado) u otros procedimientos” (Azze, 2012, pág. 183).

El procedimiento simplificado sería el siguiente:

1. El anticuerpo de captura se inmoviliza sobre la placa.
2. Se añade la muestra que contiene el antígeno de interés que se unirá al anticuerpo de captura.
3. Se añade el anticuerpo de detección que se unirá al antígeno unido a su vez al anticuerpo de captura.
4. En caso de que el anticuerpo de detección vaya conjugado a una enzima, procederemos directamente con el 5º paso. En caso contrario, será necesario añadir

un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo de detección.

5. Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que permitirá la detección y/o cuantificación del antígeno de interés.

2.3.1.4. ELISA competitivo

“Es una variante más compleja de la técnica ELISA, también conocido como ELISA de inhibición debido al uso de un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario” (Abintek, 2021, pág. 5).

“Los anticuerpos o los antígenos son inmovilizados sobre la fase sólida y su unión con el conjugado antígeno enzima o anticuerpo-enzima, es inhibida por la presencia de analito no marcado en la muestra. Las incubaciones entre muestras y conjugados pueden ser simultanea o secuenciales. Esta última variante no es estrictamente competitiva, con ella se alcanza una mayor detectabilidad y es recomendada cuando se quieren detectar anticuerpos de baja afinidad” (Azze, 2012, pág. 182).

“Los ELISA en fase sólida, no competitivos se utilizan para determinar antígenos, haptenos o anticuerpos. Aquí el ligando no marcado compite con un ligando conjugado con enzima por un número limitado de sitios de enlace con el anticuerpo inmovilizado, y siguiendo el protocolo se retira el ligando no reactante, para así poder relacionar inversamente la cantidad de producto que se forma con la concentración del ligando no marcado en la muestra problema” (Vázquez, 2004, pág. 140).

Se utiliza generalmente para detectar y/o cuantificar antígenos presentes en muy bajas cantidades.

Según (Raquel, 2015, pág. 19) y (Vázquez, 2004, pág. 18) el procedimiento simplificado sería el siguiente:

1. El antígeno de referencia se inmoviliza sobre la placa.
2. Por otro lado, un exceso de anticuerpo primario sin marcar se incuba con la muestra que contiene el antígeno de interés, dando lugar a la formación de complejos antígeno-anticuerpo.
3. Se añade la mezcla antígeno anticuerpo a la placa, donde el antígeno de referencia competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo.
4. Se lava la placa eliminando los complejos antígeno anticuerpo solubles.
5. Se añade a la placa un anticuerpo secundario marcado con una enzima que se unirá al anticuerpo primario anclado al antígeno de referencia.
6. Se añade el sustrato que al reaccionar con la enzima proporcionará una señal visible que será inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de interés presente en la muestra.

2.3.1.5.Covid-19 ELISA

Según (Microbiologicts, 2020) el Método de ELISA para diagnóstico de covid-19 está basado en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno anticuerpo, y la que no se une es eliminada por los lavados; la unida reacciona con el sustrato (TMB), para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

2.4. Fundamentación teórica del kit Id Screen Neospora Caninum Competitios (ID. Vet Innovative Diagnostics)

ELISA de competición para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* en muestras de suero o plasma de rumiantes, caninos u otras especies sensibles. Incubación corta o nocturna.

2.4.1. Información General

Este kit de diagnóstico está diseñado para detectar anticuerpos contra *Neospora caninum* en suero o plasma de bovinos, ovinos, caprinos, caninos u otras especies susceptibles.

2.4.2. Descripción y Principio

Los pocillos están sensibilizados con un extracto purificado de *Neospora caninum*. Las muestras y los controles para ensayar se añaden en los micropocillos. Si hay presencia de anticuerpos anti-*N-caninum* se formará un complejo antígeno-anticuerpo que enmascarará los epítomos de *N. caninum*.

Un conjugado anti-*N. caninum-peroxidasa* (HRP) se añade a los micropocillos. Este se fija a los epítomos libres restantes de *N. caninum*, lo que da lugar a la formación de un complejo antígeno-conjugado-HRP.

Después de la eliminación del conjugado en exceso, el ensayo es revelado con la solución de revelación (TMB).

La coloración resultante depende de la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra a ensayar:

- En ausencia de anticuerpos, aparece una coloración azul que se convierte en amarillo después de la adición de la solución de parada

- En presencia de anticuerpos no aparece ninguna coloración.

La microplaca se lee a 450 nm.

2.3.3. Componentes del Kit

Tabla 3. *Componentes del Kit de Neospora caninum.*

| |
|--|
| Reactivos* |
| Microplacas sensibilizadas con un extracto purificado de <i>Neospora caninum</i> |
| Control Positivo |
| Control Negativo |
| Conjugado concentrado (10X) |
| Diluyente 14 |
| Diluyente 12 |
| Solución de lavado concentrada (20X) |
| Solución de revelación (TMB) |
| Solución de parada (0.5 M) |

*Las cantidades suministradas están indicadas en la etiqueta del kit.

1. El conjugado, los controles y la solución de revelación deben conservarse a 5°C (\pm 3°C).
2. Los otros reactivos pueden conservarse entre +2°C a +26°C.
3. Las soluciones de lavado, de revelación y de parada pueden ser utilizadas para toda la gama de productos de IDvet. Los diluyentes con el mismo número de lote son intercambiables.

2.3.4. Materiales necesarios no incluidos

1. Micropipetas o pipetas multicanales dispensadoras de volúmenes de 10 μ l, 100 μ l, y 300 μ l.
2. Puntas de pipetas desechables.
3. Lector de microplacas de 96 pocillos.
4. Agua destilada o desionizada.
5. Lavador de placas (manual o automático).

2.3.5. Precauciones de uso

1. No pipetear con la boca.
2. La solución de revelación puede ser irritante para la piel.
3. La solución de parada (0.5 M) puede ser peligrosa en caso de ingestión. Puede causar sensibilización en contacto con la piel (R22-43). Evitar el contacto con la piel (S24-37).
4. No exponer la solución de revelación a la luz o a agentes oxidantes.
5. Todos los reactivos deben ser descontaminados adecuadamente antes de ser eliminados.
Eliminar los productos de acuerdo con la reglamentación en vigor.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Biológicos:

Tabla 4. *Materiales biológicos.*

| Descripción | Cantidad |
|-------------|----------|
| Caninos | 188 |

3.1.2. Físicos

Tabla 5. *Materiales de Laboratorio*

| Descripción | Unidad | Cantidad |
|-----------------------|------------------------|----------|
| Centrifugadora | Unidad | 1 |
| Refrigeradora | Unidad | 1 |
| Pipetas | Caja | 1 |
| Tubo de tapa roja | Paquete (100 unidades) | 2 |
| Tubos de Eppendorf | Paquete (100 unidades) | 2 |
| Termómetro | Unidad | 1 |
| Jeringas 3ml | Caja (100 unidades) | 2 |
| Torniquete | Unidad | 1 |
| Mascarilla | Caja | 1 |
| Guantes | Caja | 1 |
| Mandil | Unidad | 1 |
| Bozal | Unidad | 1 |
| Maquina Rasuradora | Unidad | 1 |
| Lector de ELISA | Unidad | 1 |
| Vortex | Unidad | 1 |
| Vaso de precipitación | Unidad | 2 |
| Gradilla | Unidad | 2 |

Tabla 6. *Materiales de oficina.*

| Descripción | Unidad | Cantidad |
|---------------------|--------|----------|
| Impresora | Unidad | 1 |
| Laptop | Unidad | 1 |
| Hojas de papel bond | Resma | 1 |
| Tinta de Impresión | Unidad | 1 |
| Esferos | Unidad | 1 |

3.1.3. Químicos

Tabla 7. *Soluciones químicas.*

| Descripción | Unidad | Cantidad |
|-----------------------------|--------|----------|
| Alcohol | Frasco | 1 |
| Placa de microtitulación | Unidad | 2 |
| Solución de lavado | Frasco | 1 |
| Conjugado específico | Vial | 1 |
| Control negativo y positivo | Vial | 2 |
| Solución de Frenado | Frasco | 1 |

3.1.4. Materiales de Campo

Tabla 8. *Materiales para campo.*

| Descripción | Unidad | Cantidad |
|---------------------|--------------|----------|
| Botas | Unidad (par) | 1 |
| Gorro | Unidad | 1 |
| Overol | Unidad | 1 |
| Equipo de disección | Unidad | 1 |
| Cooler | Unidad | 1 |

3.2. Metodología

3.2.1. Selección y tamaño de la muestra

Para la investigación se realizó en primera instancia un examen clínico, semiológico con la cual se determinó que los animales se encuentran aparentemente sanos, libres de situaciones estresantes. El número de animales a muestrear son 188, 94 hembras y 94 machos. Se tomaron en cuenta datos como lugar donde viven, convivencia con otras especies animales, esto nos ayudó a dar una mejor y acertada determinación de prevalencia de la enfermedad en el sector.

3.2.2. Obtención y centrifugación de las muestras sanguíneas

- Para la obtención de las muestras, se realizó mediante la venopunción de la vena cefálica para lo cual se utilizó un método de sujeción correcta del animal, con el apoyo de un ayudante.
- Se procede hacer la esterilización de área. En la punción se utilizó un catéter N: 22 la cual se le introduce directamente a la vena.
- Se procedió a extraer 5ml de sangre y se colocó en un tubo Vacutaner sin anticoagulante (tapa roja).
- Luego se centrifugó la muestra por 5 minutos a 3500 revoluciones por minuto.
- Centrifugada las muestras se procedió a extraer el suero con ayuda de una pipeta y se colocó en tubos eppendorf de 1,5ml.
- Rotularemos las muestras con los siguientes datos del paciente: nombre, número de muestra, fecha de toma de muestra.
- Posteriormente se congeló a -4°C hasta completar el total de muestras.

- Finalmente procedimos a realizar el diagnóstico serológico mediante la prueba de ELISA.

3.2.3. Almacenamiento y transporte de las muestras

“La muestra debe quedar perfectamente identificada en el momento de la extracción, el tiempo óptimo entre la extracción de la sangre y su recepción en el laboratorio debería ser inferior a una hora.” (Adaluz, 2009).

3.2.4. Preparación de las muestras

Para evitar diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras, se preparó una microplaca de 96 pocillos que contenga las muestras y los controles a ensayar, antes de transferirlos a la microplaca de ELISA utilizando una pipeta multicanal.

2.3.5. Preparación de la solución de lavado

Preparar la Solución de Lavado (1X) diluyendo 1:20 la Solución de Lavado Concentrada (20X) en agua destilada/desionizada

Los resultados pueden ser influenciados dependiendo de la calidad del lavado. Se asegura que los pocillos se encuentren completamente vacíos entre cada lavado. Si utiliza una máquina de lavado automática, es de suma importancia ajustar correctamente los parámetros (modo, tipo y altura de aspiración).

2.3.6. Procedimiento del ensayo

Se debe permitir que todos los reactivos estén equilibrados a temperatura ambiente 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) antes de la utilización. Homogenizarlos por medio de la inversión o utilizando un vortex.

2.3.6.1. Incubación corta

1. Añadir:

- 50 µl de Diluyente 14 a cada pocillo.
- 50 µl de Control Positivo a los pocillos A1 y B1.
- 50 µl de Control Negativo a los pocillos C1 y D1.
- 50 µl de la muestra a ensayar en los pocillos restantes.
- Cubrir la placa e incubar 45 min ± 4 min at 37°C (± 3°C).

2.3.6.2. Incubación nocturna

2. Añadir:

- 90 µl de Diluyente 14 a cada pocillo.
- 10 µl de Control Positivo a los pocillos A1 y B1.
- 10 µl de Control Negativo a los pocillos C1 y D1.
- 10 µl de la muestra a ensayar en los pocillos restantes.
- Cubrir la placa e incubar durante la noche (16 -20 horas) a 21°C (± 5°C).

2.3.7. Para todos los procedimientos propuestos

3. Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 3 veces con al menos 300 µl la Solución de lavado. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados.
4. Preparar el Conjugado 1X haciendo una dilución 1:10 del Conjugado Concentrado 10X con el Diluyente 12.
5. Añadir 100 µl del Conjugado 1X a cada pocillo.
6. Cubrir la placa e incubar 30 min ± 3 min a 21°C (± 5°C).
7. Vaciar los pocillos. Lavar cada pocillo 3 veces con al menos 300 µl de la Solución de lavado. Evitar que los pocillos se sequen entre los lavados

8. Añadir 100 µl de la Solución de revelación a cada pocillo.
9. Cubrir la placa e incubar 15 min ± 2 min a 21°C (± 5°C) en la obscuridad.
10. Distribuir 100 µl de Solución de parada a cada pocillo, en el mismo orden que en el paso 8, para detener la reacción.
11. Leer y grabar la D.O. a 450 nm.

2.3.8. Validación

El ensayo es validado si:

- ✓ El valor medio de la D.O. del Control Negativo (DOCN) es mayor que 0.7.

$$\text{DOCN} > \mathbf{0.700}$$

- ✓ La razón entre el valor medio de la D.O. del Control Positivo (DOCP) y el valor medio de la D.O del Control Negativo (DOCN) es menor que 0.3.

$$\text{DOCP} / \text{DOCN} < \mathbf{0.3}$$

2.3.9. Interpretación

Para cada muestra, calcular el porcentaje de competición (S/N %).

$$\frac{S}{N} \% = \frac{DO_{\text{muestra}}}{DO_{\text{cn}}} * 100$$

Las muestras que presentan un S/N%:

2. Menor o igual que 50 % son interpretadas como positivas.
3. Mayor que 50 % y menor o igual que 60% son interpretadas como dudosas.
4. Mayor que 60 % son interpretadas como negativas.

Tabla 9. *Tabla de valores de interpretación de resultados*

| Resultado | Interpretación |
|------------------|----------------|
| S/N% ≤ 50% | POSITIVO |
| 50% < S/N% ≤ 60% | DUDOSO |

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

Tabla 12. Resultados Interpretadas con la fórmula de Elisa cuantitativa

| Elisa cuantitativo | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------------------|------------|------------|------------|------------|--------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Positivos 4,25% | | | | | | | | | | | | Negativos 95,74% | | | | | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 |
| A | 11,12 Contr ol | 87,8 9 | 35,6 6 | 78,0 3 | 117, 88 | 121, 87 | 105, 30 | 110, 75 | 115, 68 | 138, 23 | 134, 35 | 138, 86 | 101, 52 | 108, 86 | 94,0 7 | 106, 76 | 63,45 | 76,4 6 | 71,2 1 | 101, 63 | 120, 50 | 180, 28 | 104, 77 | 111, 69 |
| B | 17,30 Contr ol | 111, 48 | 97,8 5 | 94,2 8 | 99,8 4 | 100, 26 | 94,3 9 | 118, 20 | 103, 51 | 112, 74 | 108, 13 | 103, 20 | 93,1 3 | 118, 20 | 101, 00 | 78,6 6 | 69,64 | 53,7 0 | 76,5 6 | 82,7 5 | 83,6 9 | 102, 78 | 94,8 1 | 76,1 4 |
| C | 101,3 Contr ol | 103, 20 | 96,8 0 | 102, 88 | 65,1 3 | 101, 31 | 99,1 1 | 107, 39 | 99,0 0 | 127, 22 | 99,5 3 | 127, 01 | 71,1 1 | 114, 74 | 109, 07 | 107, 39 | 115,05 | 70,6 9 | 67,1 2 | 102, 57 | 92,8 2 | 71,2 1 | 92,9 2 | 67,6 5 |
| D | 98,69 Contr ol | 88,9 4 | 103, 72 | 92,4 0 | 100, 68 | 109, 60 | 104, 56 | 108, 13 | 109, 81 | 109, 81 | 97,6 4 | 119, 24 | 47,9 3 | 103, 09 | 81,7 0 | 70,5 8 | 68,38 | 148, 40 | 157, 00 | 159, 73 | 154, 90 | 126, 48 | 82,5 4 | 62,1 9 |
| E | 103,5 1 | 86,1 0 | 94,9 1 | 95,5 4 | 78,3 4 | 89,0 4 | 93,5 5 | 99,7 4 | 101, 52 | 48,9 8 | 40,0 6 | 108, 44 | 77,6 1 | 108, 97 | 111, 06 | 66,3 9 | 79,29 | 70,6 9 | 115, 57 | 106, 24 | 77,5 0 | 93,6 5 | 69,8 5 | 81,1 7 |
| F | 85,37 | 91,1 4 | 102, 46 | 89,9 8 | 85,6 8 | 111, 69 | 103, 72 | 85,3 7 | 88,5 2 | 105, 19 | 105, 51 | 106, 87 | 105, 40 | 94,1 8 | 90,0 9 | 80,7 6 | 87,89 | 41,2 2 | 115, 26 | 99,9 5 | 94,7 0 | 82,7 5 | 70,6 9 | 105, 72 |
| G | 90,93 | 94,9 1 | 94,4 9 | 83,2 7 | 90,7 2 | 103, 62 | 97,4 3 | 87,6 8 | 101, 52 | 103, 09 | 98,3 7 | 116, 83 | 94,1 8 | 79,6 0 | 79,0 8 | 78,5 5 | 71,63 | 75,2 0 | 93,1 3 | 88,5 2 | 79,5 0 | 94,0 7 | 73,6 2 | 82,7 5 |
| H | 119,7 1 | 84,1 0 | 98,9 0 | 101, 52 | 93,0 3 | 109, 70 | 25,3 8 | 88,3 1 | 113, 16 | 104, 35 | 112, 53 | 96,3 8 | 117, 57 | 98,9 0 | 88,8 3 | 29,6 8 | 87,05 | 101, 00 | 109, 81 | 104, 35 | 94,4 9 | 88,5 2 | 94,6 0 | 106, 55 |

Tabla 13. *Porcentajes de los resultados de las muestras analizadas.*

| | Total de muestras analizadas | Porcentaje |
|---------------------------|------------------------------------|------------|
| Interpretación | 188 | 100% |
| Casos positivos o dudosos | 8 | 4,25% |
| Casos negativos | 180 | 95,75% |

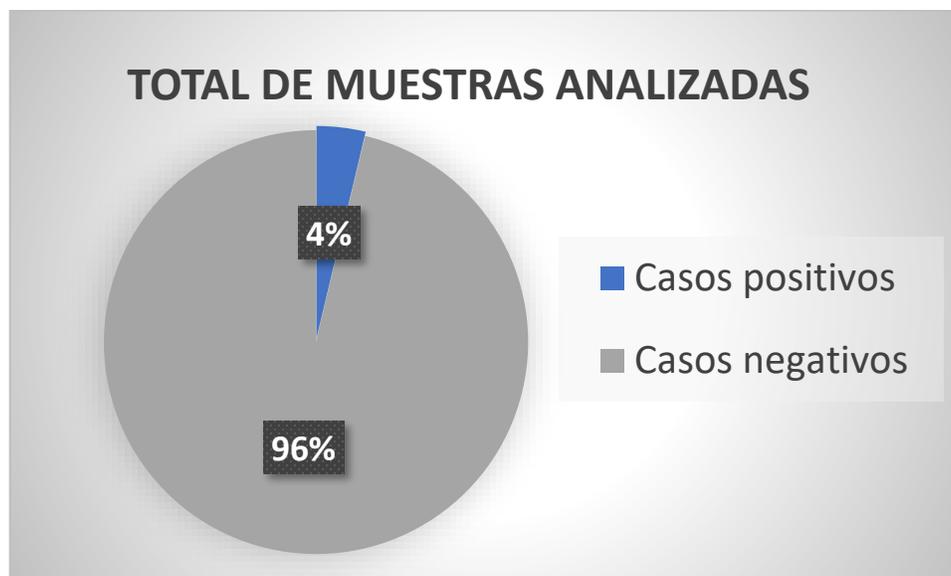


Figura 4. Representación gráfica de los porcentajes encontrados con la prueba de Elisa cuantitativa.

En la tabla 13 e ilustración 4 se ve reflejada el número total de caninos que fueron muestreados (188) que representa el 100% que por medio de la técnica de ELISA Cuantitativo se observó un total de 8 casos positivos o dudosos que representa el 4,25% del total de los animales muestreados y 180 casos negativos el cual representa un 95,74% del total.

Tabla 14. Resultados de casos dudosos o positivos a *N. caninum* encontrados de acuerdo con el sexo.

| SEXO | CASOS DUDOSOS O POSITIVOS SEGÚN EL SEXO | PORCENTAJE (%) |
|---------|---|----------------|
| HEMBRAS | 6 | 75% |
| MACHOS | 2 | 25% |
| TOTAL | 8 | 100% |



Figura 5. Resultados de casos positivos a *N. caninum* encontrados de acuerdo con el sexo.

En la tabla 14 e ilustración 5 se puede observar que al realizar las pruebas de ELISA Cuantitativo se muestra el mayor porcentaje de casos positivos en caninos hembras con 6 casos representando el 75% mientras que en machos se presentan 2 casos positivos lo cual nos indica un porcentaje del 25% del 100% de los casos positivos.

4.2. Discusión

En la tabla 13 e ilustración 4 se ve reflejada el número total de caninos que fueron muestreados (188) que representa el 100% que por medio de la técnica de ELISA Cuantitativo se observó un total de 9 casos positivos o dudosos que representa el 4,25% del total de los animales muestreados y 180 casos negativos el cual representa un 95,74% del total.

En la tabla 14 e ilustración 5 se puede observar que al realizar las pruebas de ELISA Cuantitativo se muestra el mayor porcentaje de casos positivos en caninos hembras con 6 casos representando el 75% mientras que en machos se presentan 2 casos dudosos o positivos lo cual nos indica un porcentaje del 25% del 100% de los casos dudosos o positivos.

El factor de riesgo tomado en cuenta en este estudio que es el sexo según la bibliografía se ha podido determinar que no existe asociación epidemiológica entre esta variable y la enfermedad, es decir que afecta tanto a machos como a hembras. En un estudio realizado en China se tomó muestra de suero de 1176 perros, de los cuales 617 fueron machos, obteniéndose de ellos 97 animales positivos a neosporosis, es decir el 15,72% de prevalencia; por otra parte 559 fueron hembras, encontrándose 75 muestras positivas (13,42%). Con estos resultados se pudo afirmar que no existe una asociación estadística de la enfermedad con el sexo, si bien se pudo observar que hubo un mayor número de casos en machos la diferencia entre ambos no fue relevante.

En el estudio (Del Campos, 2003), tuvo como objetivo determinar la frecuencia de *N. caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima. Se evaluaron 104 muestras de suero de caninos mayores a 3 meses de edad, provenientes de 23 establos lecheros, mediante la detección de anticuerpos contra *N. caninum* a través de la prueba de inmunofluorescencia

indirecta. El $32.7 \pm 9.0\%$ (34/104) de las muestras fueron positivas a *N. caninum* en una dilución de 1:50, siendo las provincias del Huaura y Huaral las que tuvieron los mayores niveles de seropositividad (58.8%, 10/17). No se hallaron diferencias estadísticas significativas en las variables edad y sexo.

En el estudio realizado por (Cornejo, 2004) para determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del valle del Mantaro. Se evaluaron 124 sueros de perros, provenientes de 24 establos lecheros de las provincias de Huancayo, Jauja y Concepción. Se halló una prevalencia de anticuerpos contra *N. caninum* de $19.4 \pm 7.0\%$ (24/124), en una dilución de 1:50, mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta. El porcentaje de establos que poseían al menos un perro infectado fue de 62.5% (15/24). No se halló asociación entre la tasa de infección y las variables ubicación geográfica (provincia), edad, sexo y procedencia (en el establo o en los alrededores). Estos resultados demuestran que los caninos del valle del Mantaro presentan una prevalencia moderada de infección con *N. caninum*; y considerando que dicha infección está presente en la mayoría de los establos de la zona, se recomienda el control del acceso de los canes a los establecimientos lecheros en el valle del Mantaro.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Con los datos obtenidos en esta investigación utilizando la prueba de ELISA Cuantitativo para *Neospora caninum* se observó una prevalencia positiva o dudosa de presencia de enfermedad del 3,72% del total de 188 (100%) muestras serológicas.

Se concluye que el sexo no es un factor de riesgo muy relevante en esta enfermedad debido a que se presentan tanto en machos como en hembras, con este estudio se ve reflejado que el 85,71% de los casos positivos o dudosos se presenta en hembras y el 14,29% en machos.

En la relación epidemiológica de la enfermedad no existe factores mayores de riesgo según el sexo, la edad, la urbanización en donde se encuentre ni la procedencia del camino muestreado.

Los caninos en haciendas ganaderas se mantienen en contacto directo con los bovinos por lo tanto se concluye que mediante otro tipo de análisis con diferente tipo de muestras como la serología bovina se podría hacer nuevos estudios.

5.2. Recomendaciones

La neosporosis canina es una enfermedad que afecta más a animales inmunodeprimidos por lo tanto se recomienda mantener a los animales con una inmunidad buena y separarlas de los hatos ganaderos en casos de sospecha debido a que es probable que se desencadene una pérdida económica alta.

Utilizar otro tipo de muestreos para detección de la Neosporosis en los caninos manteniendo todas las medidas higiénico sanitarias al momento del contacto directo en la recolección de placentas probablemente infectadas o fetos abortadas para su futuro análisis. La determinación de prevalencia de la Neosporosis se podría realizar mediante el análisis con los Kits de Elisa aplicados en muestras serológicas bovinas.

Bibliografía

Abintek. (18 de 3 de 2021). *Biotech Spain. Articulos*. Obtenido de biotech-spain.com:

<http://biotech-spain.com/es/articles/tipos-de-elisa-conoces-las-diferencias/>

Adaluz. (2009). Manual de obtencion y manejo de muestras para el laboratorio clinico.

Servicio Adaluz de Salud, pag. 12.

Aguilar, M. (04 de 05 de 2017). *Muy interesante*. Obtenido de www.muyinteresante.es:

[https://www.muyinteresante.es/mascotas/articulo/el-origen-del-perro-](https://www.muyinteresante.es/mascotas/articulo/el-origen-del-perro-611493135998)

[611493135998](https://www.muyinteresante.es/mascotas/articulo/el-origen-del-perro-611493135998)

Armadans, T. (2013). *Guía de perros*. Barcelona: Komet Verlag GmbH.

Azze, R. F. (2012). *TÉCNICAS INMUNOENZIMÁTICAS PARA ENSAYOS CLÍNICOS DE VACUNAS Y ESTUDIOS INMUNOEPIDEMIOLÓGICOS* (Primera Edición ed.). La

Habana, Cuba: Finlay Ediciones.

Besteiros, M. (11 de Julio de 2019). *Experto animal*. Obtenido de expertoanimal.com:

<https://www.expertoanimal.com/neosporosis-canina-neospora-caninum-sintomas-y-tratamiento-24334.html>

Bestieros, M. (1 de Septiembre de 2019). *Soy un perro*. Obtenido de soyunperro.com:

<https://soyunperro.com/neosporosis-canina/>

Bulla Blanco, K. D. (01 de 01 de 2015). *Identificacion de neospora caninum en materia fecal de 60 caninos en hatos lecheros en el municipio el Rosal, Cuidinamarca*.

Colombia: Bogota D.C. Obtenido de Universidad de La Salle Ciencia Unisalle:

https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1103&context=medicina_veterinaria

- Campero, C. (2002). *INTA*. Obtenido de Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.:
http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/sanidad/enf_repro/NC2002.pdf.
- campo, E. a. (2003). Frecuencia de *Neospora caninum* en Perros de establos lecheros del Valle de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 145-149.
- Cordero del Campillo, M. y. (2000). *Parasitología Veterinaria: Parte III: Cap. 1: Parasitosis del sistema reproductor. 1 Edición*. Madrid: McGrawHill-Interamericana de España.
- Cornejo, N. C. (2004). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del Valle del Mantero . *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 15 (1).
- Del Campos, J. C. (2003). Frecuencia de *Neospora Caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 2-3.
- Dubey, J., & Lappin, M. (2008). *Toxoplasmosis y neosporosis. En Enfermedades infecciosas del perro y gato. Volumen 2*. Ciudad Autonoma de Buenos Aires, Argentina.: Tercera edición. Greene, C.E. Editorial Inter Medica.
- Dubey, J., Hemphill, A., Calero Bernal, R., & Schares, G. (2017). *Neosporosis in Animals. Primera edición*. . Editorial Tailor & Francis.
- Garcia, M. (6 de Junio de 2019). *Experto Animal*. Obtenido de www.expertoanimal.com:
<https://www.expertoanimal.com/10-caracteristicas-de-los-perros-24265.html>
- Gomez, N., & Guida, N. (2010). *Neosporosis: enfermedades infecciosas de caninos y felinos. Primera edición*. Ciudad Autonoma de Buenos Aires, Argentina: Editorial InterMedica.

- Gottstein, B. (2002). Neospora Caninum: Causa de Aborto en Bovinos. *XXII. Congreso Mundial de Buitria, Hannover*. Alemania: CDVSA.
- HIPRA. (2020). *Bovine neosporosis*. Obtenido de hipra.com:
<https://www.hipra.com/portal/es/hipra/knowledge/bgdetail/bovine-neosporosis/bovine-neosporosis>
- Jiménez, C. A. (2001). *Helvia: Repositorio Institucional de la Universidad de Córdoba*. Obtenido de Helvia.ecu.es:
<https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/305/13076334.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jorge, J. d. (14 de 11 de 2013). Los perros se originaron en Europa hace más de 18000 años. *ABC CIENCIA*. Obtenido de Los perros se originaron en Europa hace mas de 18.000 años: https://www.abc.es/ciencia/20131114/abci-perros-surgieron-europa-hace-201311141707.html?ref=https:%2F%2Fwww.google.com%2F#disqus_thread
- Lerner, A. (2020). *vets & clinics* . Obtenido de www.affinity-petcare.com:
<https://www.affinity-petcare.com/vetsandclinics/es/alimentacion-en-cachorros-cuidados-especiales-con-inmunoglobulinas>
- Maps, G. (2021). *Google maps*. Obtenido de www.google.com:
<https://www.google.com/maps/place/Chorocopte/@-2.5857447,-78.9770606,14z/data=!4m5!3m4!1s0x91cd68f17e562961:0xe3ea069ed064e7a8!8m2!3d-2.5997833!4d-78.9627624>
- Melendez, P. C. (1999). Evidencia serologica de Neospora caninum en un rebaño lechero de la zona central de Chile. *Avances de Ciencias Veterinarias* , 14 (1-2).

Microbiologics, v. (2020). *Vircell*. Obtenido de www.vircell.com:

<https://www.vircell.com/producto/covid-19-elisa/>

Oswaldo E. Vale Echeto, J. D. (2002). NIVELES DE INMUNOGLOBULINAS (IgM, IgG e IgA) EN SUERO SANGUINEO DE BUFALOS S DE AGUA, BAJO DOS SISTEMAS DE AMANTAMIENTO DIFERENTES. *Revista Científica, FCV-LUZ/Vol. XII, N*3, 193-210, 2-3*.

OVIEDO, e. a. (1 de Enero de 2007). *Estudio serológico sobre neosporosis en bovinos con problemas reproductivos en Monteria, Cordoba, Colombia*. Obtenido de Revista MVZ Córdoba: <https://doi.org/10.21897/rmvz.437>

Pérez López, J., Giangreco, S., & Guerrero, I. (Octubre de 2019). *ridaa. unicen.edu.ar*.

Obtenido de UNICEN:

[https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/2246/PEREZ%20LOPEZ%2C%20JULIETA.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20neosp%20osis%20canina%20es%20una,c%C3%A1nidos%20\(dom%C3%A9sticos%20y%20salvajes\).](https://www.ridaa.unicen.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/123456789/2246/PEREZ%20LOPEZ%2C%20JULIETA.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=La%20neosp%20osis%20canina%20es%20una,c%C3%A1nidos%20(dom%C3%A9sticos%20y%20salvajes).)

Plus, P. (2 de Junio de 2020). *WEB CONSULTAS*. Obtenido de Revista de salud y bienestar : <https://www.webconsultas.com/curiosidades/anticuerpos-que-son-y-como-nos-protegen-frente-a-infecciones>

Raquel, S. R. (2015). *Determinación de niveles de anticuerpos IgG contra neumococo vacunados contra neumococo mediante técnica de elisa*. Quito: UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.

Ripoll, M. (2006). *CONSEJOS DEL VETERINARIO*. Obtenido de www.colvena.org: <http://www.colvema.org/pdf/consejos/origenperrogato.pdf>

- Sánchez Ubillús, L. A. (2014). *Incidencia de abortos con serología positiva a neospora caninum en bovinos lecheros en el distrito de moche, departamento La Libertad*. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo.
- Silva, R., & Manchado, G. (2016). *Canine neosporosis: Perspectives on pathogenesis and management*. Veterinary Medicine: Research and Reports.
- Sykes, J. (2014). Neosporosis en canine and Felinne Infectious Diseases. *Editorial Elseiver*. Barcelona, España, págs. 704-712.
- tiempo, t. (2020). *tierra.tutiempo.net*. Obtenido de Tu tiempo: <https://tierra.tutiempo.net/ecuador/chorocopte-ec002762.html>
- Troxel, M. (2009). *Infectious Neuromuscular Diseases of Dogs and Cats*. Companion Animal Medicine.
- Vargas, J. C. (2001). Neospora caninum, ¿Una zoonosis Potencial? *Revista de Salud Publica*, 1.
- Vargas, J., & Cortes, J. (2021). Neospora caninum, Una Zoonosis Potencial? *Revista de Salud Publica vol. 3 no.1 Bogota*, 2-3. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642001000100007
- Vázquez, E. G. (2004). *Química fármaco Biología*. Philadelphia: Medigraphic.
- Yuil, J. M. (2012). *Elisa y sus aplicaciones*. México: DF, México.

6. ANEXOS

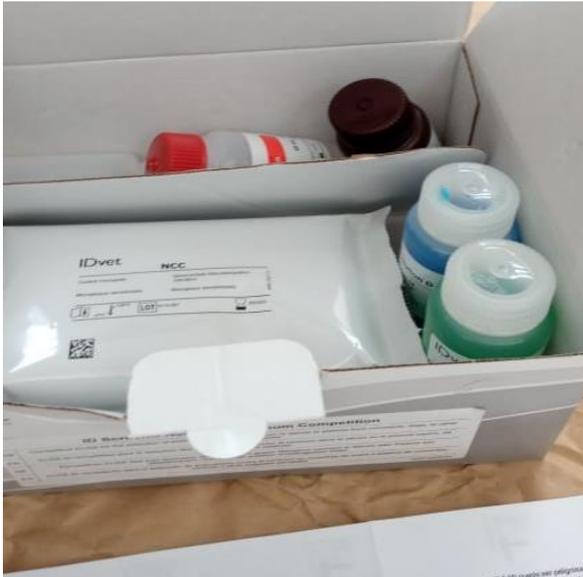


Figura 6. Kit de Nesopora caninum



Figura 8. Toma de muestra



Figura 7. Instrucciones e indicaciones del Kit.



Figura 9. Puntas amarillas



Figura 10. Probeta con agua destilada.



Figura 12. Muestras serológicas



Figura 11. Vaso de precipitado.



Figura 13. Calibración de pipetas.



Figura 14. Inicio de proceso Pipeteado.



Figura 16. Lavado de cultivo.



Figura 15. Añadición de medio de contraste.

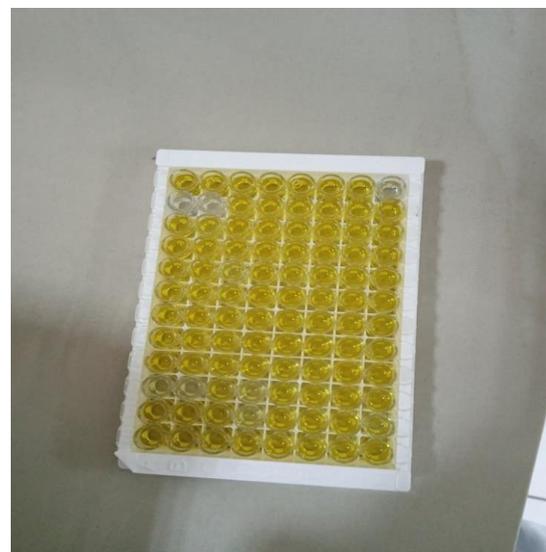


Figura 17. Placa lista para lector de ELISA



Figura 18. Lector de ELISA