



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“PREVALENCIA DE *Neospora caninum* EN POBLACIONES CANINAS (ALBERGUES,
FINCAS Y CLÍNICAS) MEDIANTE ELISA COMPETITIVO”

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Médico Veterinario Zootecnista

AUTOR: DANIEL ISAAC LUNA DÍAZ

TUTOR: ING. MAURICIO XAVIER SALAS RUEDA, MSc.

Cuenca - Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, Daniel Isaac Luna Díaz con documento de identificación N° 0350123196, manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 07 de junio del 2023.

Atentamente,



Daniel Isaac Luna Díaz

0350123196

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Daniel Isaac Luna Díaz con documento de identificación N° 0350123196, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Trabajo experimental: “Prevalencia de *Neospora caninum* en poblaciones caninas (albergues, fincas y clínicas) mediante ELISA competitivo”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Médico Veterinario Zootecnista, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 07 de junio del 2023.

Atentamente,



Daniél Isaac Luna Díaz

0350123196

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mauricio Xavier Salas Rueda con documento de identificación N° 0603329681, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “PREVALENCIA DE *Neospora caninum* EN POBLACIONES CANINAS (ALBERGUES, FINCAS Y CLÍNICAS) MEDIANTE ELISA COMPETITIVO”, realizado por Daniel Isaac Luna Díaz con documento de identificación N° 03501213196, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 07 de junio del 2023.

Atentamente,



Ing. Mauricio Xavier Salas Rueda, MSc.

0603329681

DEDICATORIA

La presente tesis va dedicada a mis amados padres: Raúl Edmundo Luna Rodríguez y Sylvia Janeth Díaz Rosero, por la paciencia, la dedicación y esfuerzo que realizaron para que pueda alcanzar esta meta.

A mis hermanos: David Santiago Luna Díaz y Raúl Esteban Luna Díaz, porque en este tiempo su incondicional amistad, aprecio y cariño me infundieron el aliento necesario para continuar el camino.

AGRADECIMIENTO

Agradecer a Dios por sobre todo, porque me ha brindado la salud y las fuerzas para seguir adelante.

A mis padres; los señores Raúl Luna y Sylvia Díaz, por su apoyo, por su tiempo, por sus consejos y por ser una guía en mi formación académica y personal.

A mis hermanos: David Santiago Luna Díaz y Raúl Esteban Luna Díaz, porque en este tiempo su incondicional amistad, aprecio y cariño me infundieron el aliento necesario para continuar el camino.

A las personas que laboran en los Albergues, fincas y en especial a los propietarios de la Clínica Veterinaria “Arca de Noé”; quienes fueron uno de los pilares principales para el desarrollo del presente trabajo.

Al Doctor Fernando Moscoso Merchán, Vicerrector de la sede Cuenca quién me demostró la esencia del Espíritu Salesiano a través del apoyo en cuanto a la gestión pedagógica y económica que me permitió culminar con este requisito.

A la Institución Salesiana y a través de ella al grupo de Docentes que intervinieron en mi formación profesional.

A la Doctora Patricia Peralta por su ayuda y asesoramiento en el área de laboratorio.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Problema	16
1.2 Delimitación.....	16
1.2.1 Espacial.....	16
1.2.2 Temporal.....	17
1.2.3 Académica	17
1.3 Explicación del problema	18
1.4 Objetivos	18
1.4.1 Objetivo General.....	18
1.4.2 Objetivos Específicos	18
1.5 Hipótesis	18
1.5.1 Hipótesis Alternativa	18
1.5.2 Hipótesis Nula	18
2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL	19
2.1 Generalidades.....	19
2.2 Perro doméstico (<i>Canis lupus familiaris</i>)	19
2.3 Neosporosis.....	20
2.4 Historia.....	21

2.5	Distribución geografica.....	21
2.6	Etiología.....	22
2.7	Epidemiologia.....	22
2.8	Taxonomía	24
2.9	Morfología	24
2.10	Ciclo Biológico	25
2.11	Hospedadores.....	27
2.12	Signos clínicos.	28
2.13	Diagnóstico	29
2.14	Pronóstico	31
2.15	Tratamiento	31
2.16	Prevención	32
2.17	Parásitos que pueden causar abortos en Bovinos.....	33
2.18	Incidencia en Bovinos.....	33
2.19	Transmisión en Bovinos	34
2.20	Patogenia en Bovinos.....	34
2.21	Síntomas en Bovinos	35
2.22	Diagnóstico en Bovinos	36
2.23	Factores de riesgo en Bovinos	37
2.24	Pérdidas ocasionadas por la neosporosis en Bovinos	38

2.25	Hallazgos de necropsias	39
2.26	Extracción de sangre	39
2.27	ELISA	41
2.27.1	Principio de Elisa.....	41
2.27.2	Tipos de ELISA	41
2.28	Resumen del estado del arte del estudio del problema.	48
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1	Materiales.....	50
3.1.1	Materiales de oficina	50
3.1.2	Materiales de campo.....	51
3.1.3	Materiales de laboratorio	52
3.1.4	Materiales químicos.....	53
3.1.5	Materiales Biológicos.....	53
3.2	Metodología.....	54
3.3	Análisis Estadístico.....	54
3.4	Población y Muestra	54
3.4.1	Procedimiento de campo	55
3.4.2	Procedimiento de laboratorio.....	55
3.5	Variables de estudio.....	59
3.5.1	Variables Independientes: Suero sanguíneo de caninos.....	59

3.5.2	Variables Dependientes: ELISA competitivo para <i>Neospora caninum</i>	59
3.6	Consideraciones Éticas	59
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
4.1	Prevalencia de <i>Neospora caninum</i> en caninos.....	61
4.2	Discusión.	64
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	68
5.1	Conclusiones	68
5.2	Recomendaciones	68
6.	Bibliografía.....	70
7.	ANEXOS.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Vista satelital de la ciudad Cuenca.....	17
<i>Figura 2:</i> Tipos de ELISA.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Materiales de Oficina</i>	50
Tabla 2. <i>Materiales de campo</i>	51
Tabla 3. <i>Materiales de laboratorio</i>	52
Tabla 4. <i>Materiales químicos</i>	53
Tabla 5. <i>Materiales Biológicos</i>	53
Tabla 6. <i>Variables Independientes</i>	59
Tabla 7. <i>Variables Dependientes</i>	59
Tabla 8. <i>Prevalencia total: Albergues, Clínicas y Fincas del cantón Cuenca</i>	61
Tabla 9. <i>Prevalencia por edad, “Dudoso”</i>	62
Tabla 10. <i>Prevalencia por edad, “Positivo”</i>	62
Tabla 11. <i>Prevalencia por procedencia, “Dudoso”</i>	62
Tabla 12. <i>Prevalencia por procedencia, “Positivo”</i>	63
Tabla 13. <i>Prevalencia por raza, “Dudoso”</i>	63
Tabla 14. <i>Prevalencia por raza, “Positivo”</i>	63
Tabla 15. <i>Prevalencia por sexo, “Dudoso”</i>	64
Tabla 16. <i>Prevalencia por sexo, “Positivo”</i>	64

RESUMEN

La Neosporosis se ha convertido en una enfermedad grave del ganado vacuno y canino a nivel internacional, determinándose que el huésped y agente de propagación es el perro; por lo que es imprescindible detectar la presencia del parásito en zonas ganaderas. Al ser una enfermedad cosmopolita, se ha visto la importancia de realizar estudios sobre la prevalencia de *Neospora caninum* en caninos, ya que sus observaciones al microscopio son similares a los taquizoitos y quistes tisulares del *Toxoplasma gondii* llegando a ocasionar falsos diagnósticos. Una de las tantas maneras de mitigar esta enfermedad es la de impedir o frenar su propagación, para ello es importante implementar sistemas de prevención; los mismos que se pueden iniciar con determinación de la prevalencia del parásito en lo que respecta a su huésped, en el presente trabajo se tomaron 279 muestras de suero sanguíneo de caninos del cantón Cuenca para ser analizadas mediante el “Kit de ELISA ID Screen® *Neospora caninum* Competition – NCC”, los individuos fueron separados en diferentes grupos, tales como: edad, procedencia, raza y sexo, dando como resultado global del 2,15% (6/279) de muestras positivas ante la presencia del parásito, concentrándose más su existencia en machos mestizos de edad adulta que habitan fincas.

Palabras Claves: *Neospora caninum*, ELISA, prevalencia, caninos.

ABSTRACT

Neosporosis has become a serious disease of cattle and dogs internationally, determining that the host and propagation agent is the dog; Therefore, it is essential to detect the presence of the parasite in livestock areas. Being a cosmopolitan disease, the importance of carrying out studies on the prevalence of *Neospora caninum* in canines has been seen, since its observations under the microscope are similar to tachyzoites and tissue cysts of *Toxoplasma gondii*, leading to false diagnoses. One of the many ways to mitigate this disease is to prevent or stop its spread, for this it is important to implement prevention systems; the same ones that can be started with determination of the prevalence of the parasite in regards to its host, In the present work, 279 canine blood serum samples from the Cuenca canton were taken to be analyzed using the "Kit ELISA ID Screen® *Neospora caninum* Competition - NCC", the individuals were separated into different groups, such as: age, origin, race and sex, giving as a global result 2.15% (6/279) of positive samples in the presence of the parasite, its existence being more concentrated in mixed-race males of adult age that inhabit farms.

Keywords: *Neospora caninum*, ELISA, prevalence, canines.

1. INTRODUCCIÓN

La producción ganadera se ha visto afectada en los últimos tiempos, una de las afecciones ha sido el incremento del número de abortos; por lo que se ha visto necesario establecer líneas de investigación que permitan descubrir las causas que la provocan.

Muchos investigadores coinciden que la causa del aborto suele ser provocado por contagios invasivos de parásitos, virus y bacterias, dando como consecuencia enfermedades diversas que intervienen en procesos tan importantes como lo es el de “la gestación”.

Resultados de las investigaciones concluyen que uno de los agentes, es la “*Neospora caninum*”, protozoo parásito filogenéticamente cercano a *Toxoplasma gondii*, con el cual se había confundido a menudo antes de su identificación en 1988. Es de distribución mundial y afecta a perros, rumiantes y a otras muchas especies” (UranoLab, 2019).

Esta enfermedad se ha descrito recientemente, aunque se considera que hasta 1988 cuando se demostró que el agente etiológico de esta enfermedad y de la toxoplasmosis eran especies diferentes, podría haberse diagnosticado incorrectamente como toxoplasmosis dada la similitud morfológica de los agentes etiológicos y la semejanza sintomatológica. Al igual que la toxoplasmosis es una enfermedad entérica y sistémica en el perro y posiblemente canidos silvestres, mientras que es sistemática en el resto de las especies, incluido el gato. (Gutiérrez et al., 2006, p. 29).

La *Neospora canina* se contagia mediante una transmisión horizontal, ya que al ser los perros y canidos silvestres los hospedadores definitivos descritos capaces de excretar ooquistes de este parásito, y la transmisión vertical, la cual es la principal vía de mantenimiento de la infección y que es transmitida de madres a hijos.

Este parásito causa daño tisular por necrosis en los tejidos nerviosos y musculares, por lo que si la infección es prolongada puede dejar daños irreparables en los animales.

1.1 Problema

Dubey, Schares, y Ortega-Mora (2007) afirman: “Los abortos y la mortalidad neonatal son un problema importante en las operaciones ganaderas, y la neosporosis es una de las principales causas de aborto en el ganado” (p. 324).

La *Neospora caninum* provoca a su huésped el perro alteraciones neuromusculares que desencadenan en parálisis y en cuadros crónicos que le provocaría la muerte. El crecimiento sin control de la población canina propagaría la enfermedad en el ambiente ya que su medio de transmisión es a través de las heces y fómites contaminados, influyendo sobre las diferentes poblaciones de animales de producción, particular que impactaría a la sociedad ganadera que tiene como medio de vida la cría de estos ejemplares, ya que uno de sus principales efectos es el aborto, esto implica gastos financieros que afectan la economía del ganadero.

1.2 Delimitación

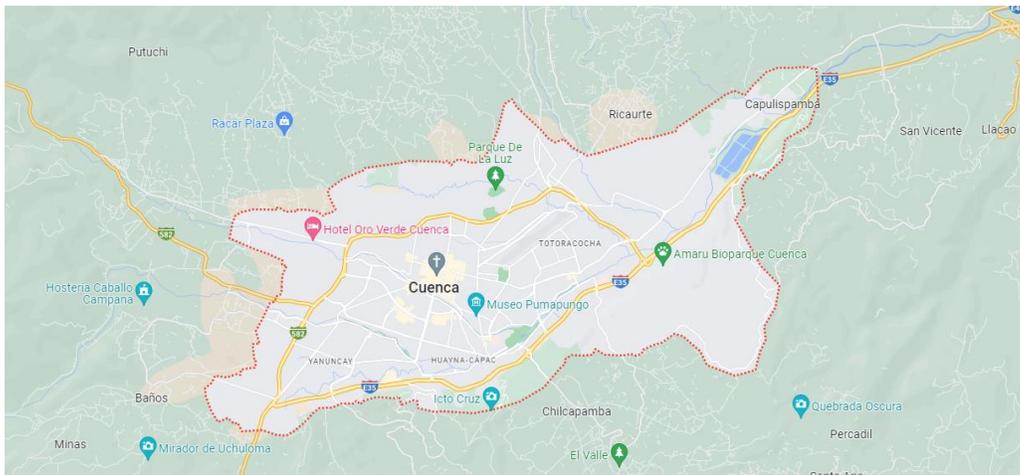
1.2.1 Espacial

La siguiente investigación se realizó a partir de las muestras que fueron recolectadas en fincas clínicas y albergues pertenecientes a parroquias del cantón Cuenca, provincia del Azuay, el cual está ubicado geográficamente entre las coordenadas 2°39' a 3°00' de latitud sur y 78°54' a 79°26' de longitud oeste, con una altura sobre el nivel del mar que varía de 100 a 4560 m.s.n.m., la zona urbana se encuentra a una altitud de 2550 m.s.n.m. aproximadamente. Limita al norte con la Provincia del Cañar, al sur con los Cantones Camilo Ponce Enríquez, San Fernando,

Santa Isabel, al oeste con las provincias del Guayas y hacia el este con los cantones Paute, Gualaceo y Sigsig. (Bermeo, 2010, p. 12).

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°53'11"S 78°59'23"O; 2°53'11"S 78°59'23"O.

Figura 1: Vista satelital de la ciudad Cuenca.



Fuente: (Google Maps, 2023).

1.2.2 Temporal

El proceso investigativo abarcó una duración de 400 horas, distribuidas en el trabajo experimental y la redacción del informe final.

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

Investigaciones dentro del campo ganadero en el Ecuador y a nivel mundial ha determinado grandes afecciones en hembras gestantes produciendo abortos y reduciendo la producción lechera; su impacto radica en la estrecha relación que se mantiene entre estas dos especies (bovino-canino), ya que requiere de ambas especies para completar su ciclo de vida.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Determinar la prevalencia de *Neospora caninum* en poblaciones caninas (Albergues, fincas y clínicas), ubicados en el cantón Cuenca, Ecuador.

1.4.2 Objetivos Específicos

Identificar la presencia de *Neospora caninum* en caninos mediante la prueba de ELISA competitivo.

Determinar la prevalencia existente en la población canina, según su hábitat, sexo, raza, edad.

1.5 Hipótesis

1.5.1 Hipótesis Alternativa

La prevalencia es alta de *Neospora caninum* en caninos (Albergues, fincas y clínicas) de Cuenca.

1.5.2 Hipótesis Nula

La prevalencia es baja de *Neospora caninum* en caninos (Albergues, fincas y clínicas) de Cuenca.

2. REVISIÓN Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y DOCUMENTAL

2.1 Generalidades

Los seres humanos hemos aprendido a comprender a los perros y a comunicarnos con ellos a lo largo de nuestra duradera relación con ellos. Hemos criado más de 1.000 razas todas y cada una de ellas con características especiales. El genoma del perro (el material genético completo que hay en un perro) se mapeó en 2003 y los resultados indicaron que el perro proviene del lobo gris. (Rosell, 2018, p. 14).

2.2 Perro doméstico (*Canis lupus familiaris*)

En 1758 Carlos Linneo (botánico, naturalista, explorador, considerado como el padre de la Taxonomía) lo clasificó como *Canis familiaris*; a esta denominación se le añadió la de *Canis lupus familiaris* por ser descendientes del lobo.

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

- Reino: Animalia (animal)
- Filo o phylum: Chordata (cordados)
- Subfilo: Vertebrata (vertebrados)
- Clase: Mammalia (mamíferos)
- Orden: Carnivora (carnívoros)
- Suborden: Caniformia
- Familia: Canidae (cánidos)
- Género: *Canis*

- Especie: *Lupus*
- Subespecie: *Lupus familiaris* = *Canis lupus familiaris*. (Hugues, Cabazas, y Torres, 2020, pp. 46, 47).

Entornos Caninos: Existen cuatro tipos básicos de entornos caninos: la ciudad, los suburbios, el campo y el exterior. Cada uno presenta un estilo de vida distinto para el perro y cada uno esconde problemas potenciales. En contra de la creencia popular, no existe un ambiente ideal para todos y cada uno de los perros. (New Skete, 2014, p. 140).

La evolución del canino está relacionada con la evolución del hombre, por lo que su distribución es mundial, históricamente la presencia de perros está documentada hace 12.000 años aproximadamente en numerosos yacimientos de Europa, Oriente Próximo, Iraq, el norte de China y Siberia, abarcando toda la extensión de la distribución ecológica actual del lobo. Este patrón sugiere que tuvieron lugar una serie de domesticaciones de manera independiente, o que grupos humanos en posesión de perros realizaron movimientos migratorios o intercambios de ejemplares domésticos con otras comunidades. Más allá del rango biogeográfico primigenio del lobo, la aparición de perros domésticos suele asociarse a la dispersión global de grupos agricultores. (Linares, 2018, p. 42).

2.3 Neosporosis

Según Moreno (2003): “La neosporosis es una enfermedad producida por *Neospora caninum*, un coccidio formador de quistes, que infecta no sólo a las principales especies de abasto, sino también a animales de compañía y a ciertos animales salvajes” (p. 252).

Dentro de las nuevas problemáticas de la salud animal se destacan las enfermedades causadas por la *Neospora Caninum*, responsable de enfermedad neuromuscular en perros y la principal

causa de abortos en el ganado bovino. A su impacto económico sobre la producción se agregan importantes trastornos y muerte en animales de compañía. (Piaggio, Delucchi, Bañales, y Easton, 2007, p. 9).

Otro factor de riesgo atribuido a la infección por *N. caninum* en bovinos es el número de perros presentes en o alrededor de una propiedad. Un estudio holandés mostró que la probabilidad de que los rebaños fueran seropositivos era del 5,5% mayor en granjas con perros que en rebaños sin perros de granja. (King et al., 2011, p. 27).

2.4 Historia

La neosporosis es una enfermedad parasitaria emergente, que viene siendo estudiada sólo desde 1989 y ha adquirido gran importancia a nivel mundial como una de las principales causas de aborto en el ganado bovino y caracterizada además, por provocar subfertilidad, pérdidas tempranas de preñez, momificaciones, abortos y nacimiento de terneros con ataxia y parálisis y en perros causa problemas neuromusculares principalmente. La Neosporosis fue reportada por primera vez en 1984 en Noruega en perros recién nacidos como enfermedad neurológica en caninos por Bjerks y colaboradores, que presentaban parálisis congénita del tren posterior a consecuencia de una meningoencefalitis. El primer aislamiento del parásito se produjo sólo hasta 1991 por Conrad y colaboradores. (López et al., 2007, p. 8).

2.5 Distribución geográfica

La neosporosis bovina es causada por *Neospora caninum* (Protozoo Apicomplexa), parásito cosmopolita con una amplia distribución geográfica. La enfermedad ha sido diagnosticada en bovinos de Europa, África, Australia, Nueva Zelanda, América y se ha evidenciado exposición

a *N. caninum* para varias especies animales en países de Sur América, tales como Argentina, Brasil, Chile, Paraguay, Perú y Uruguay. (Suárez y Maldonado, 2012, p. 36).

Se informaron anticuerpos contra *N. caninum* en 121 de 320 (37,8%) perros de Argentina, 22% de 200 perros de Nueva Zelanda, 10% de 150 perros de Turquía, 6,7% de 163 perros de Brasil, el 10% de 500 perros domésticos y el 25% de 611 perros callejeros de Brasil, el 6,4% de 1.058 perros de Italia, y en 12% de 120 perros urbanos y 26% de 81 perros rurales de Chile. Klein y Müller informaron anticuerpos contra *N. caninum* en el 4 % de 50 perros en Alemania sin signos clínicos y en el 13 % de 200 perros con signos clínicos. Se encontraron anticuerpos contra *N. caninum* en el 21,6% de 134 perros de fincas ganaderas en Paraná, Brasil. (Dubey, J., 2003, p. 8).

2.6 Etiología

Neospora caninum es un parásito protozoario del género Apicomplexa y de la familia *Sarcocystidae* que infecta a un espectro grande de mamíferos domésticos y salvajes. Los perros y coyotes son los hospederos definitivos confirmados del parásito, pero se sospecha que otros cánidos salvajes también lo pueden ser. La enfermedad que produce se denomina neosporosis y ha sido estudiada principalmente en perros y bovinos. (Retamal et al., 2010, p. 197).

2.7 Epidemiología

Neospora caninum se transmite de forma horizontal entre las especies a partir de la ingestión de ooquistes eliminados por los hospedadores definitivos o vertical a través de la placenta de las madres a sus crías. Los estadios infectantes son ooquistes esporulados, taquizoítos y bradizoítos en los quistes tisulares. La transmisión horizontal en cambio, es frecuente en caninos. (Silva, Chavez, Rivera, y Casas, 2002, p. 52).

Transmisión Horizontal: Esto ocurre por la ingestión de tejidos infectados con taquizoítos o quistes tisulares y/o por ingestión de alimentos o agua potable contaminados con ooquistes esporulados. Durante una fase aguda de infección, los taquizoítos se pueden encontrar en prácticamente todos los tejidos y fluidos del huésped, incluyendo placenta y líquido amniótico de vacas preñadas. Cuando los taquizoítos llegan a los tejidos cerebrales, pueden diferenciarse en bradizoítos, probablemente debido a la respuesta inmune contra el protozoo, resultando en la formación de quistes tisulares. (Almería, 2013, p. 2).

Transmisión vertical/congénita: Un aspecto intrigante del ciclo de vida de este parásito es su alta eficiencia en su transmisión vertical, la cual se produce durante la gestación, de la madre a cría. La eficiencia de la transmisión a menudo se cita como alta entre un 90-100%. (Reichel et al., 2014, p. 1458).

Los estudios de seroprevalencia en perro son muy recientes. Se han detectado prevalencias del 30% en Italia, 20% en Uruguay y Nueva Zelanda, pasando por 13% en España, 10% en Bélgica y Australia. Las prevalencias más elevadas corresponden a perros de zonas rurales y de granja en comparación con perros de ciudad. No se conoce si existen predisposiciones de razas o de sexo. En los hospedadores definitivos tiene lugar la formación del cigoto u ooquistes que se elimina por las heces al medio ambiente no esporulado, siendo la forma inicial de transmisión para los herbívoros. (Gutiérrez et al., 2006, p. 31).

La mayoría de los perros se infectan poco después del nacimiento, pero la prevalencia es mayor en animales viejos que en los jóvenes. Probablemente, la forma de contagio más común sea la ingestión de tejidos parasitados que constituyen, en teoría, las fuentes de infecciones más normales. Esta forma de infección, relacionada con el binomio depredador-presa, podría

explicar por qué en los perros de zonas rurales la seroprevalencia es mayor que en los urbanos. (Mañes y Rojo, 2013, p. 152).

2.8 Taxonomía

N. caninum se incluye dentro del phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimetiina y familia Sarcocystidae, juntos con los géneros *Toxoplasma*, *Sarcocysts*, *Hammendia* y *Besnoitia*. Los integrantes de la familia Sarcocystidae se caracterizan por tener ciclos biológicos heteroxenos y formar quistes en el hospedador intermediario. Todos ellos tienen como hospedadores intermediarios a diferentes especies de herbívoros y como hospedadores definitivos a diferentes especies de carnívoros. Estos últimos eliminan ooquistes sin esporular en las heces, las cuales, tras esporular en el medio ambiente presentan en su interior dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno. Cabe destacar cuatro especies estrechamente relacionadas: *N. caninum*, *T. Gandi*, *H. Hammendi* y *H. Heydorni*, cuyos ooquistes tienen un tamaño similar, sin embargo, presentan importantes diferencias biológicas y estructurales. (Álvarez, 2018, pp. 3, 4).

2.9 Morfología

Existen tres estadios diferentes: los taquizoítos, quistes tisulares con bradizoítos en su interior y los ooquistes. 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. Ultraestructuralmente, los taquizoítos derivados de cultivo celular son idénticos a los observados in vivo, poseen una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, un complejo apical formado por: 22 microtúbulos subpeliculares, dos anillos apicales, un conoide y un anillo polar; organelas secretoras compuestas por: micronemas, 8-24 roptrias y gránulos densos; mitocondria, núcleo, nucleolo, aparato de Golgi, ribosomas,

polisomas, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplásmico liso rugoso y un poro posterior. Los quistes miden aproximadamente 100 μm de diámetro, tienen forma redondeada u oval y pueden contener en su interior hasta 200 bradizoítos. 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. Los bradizoítos tienen más gránulos de amilopectina, son de aproximadamente 6-8 μm de longitud por 1-1,8 μm de anchura y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor y los ooquistes de *N. caninum* son morfológicamente similares a los de *T. gondii* y *H. heydorni*; tienen forma esférica o subesférica y 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 micropilo. En su interior se encuentran dos esporoquistes elipsoidales (8,4 μm de longitud por 6,1 μm de anchura) con 4 esporozoítos cada uno (6,5 μm de longitud por 2,0 μm de anchura) de forma alargada y el cuerpo residual esporoquístico. (Collantes, 2006, p. 6).

2.10 Ciclo Biológico

Este parásito tiene un ciclo de vida, que incluye al perro como hospedero definitivo, ya que en las heces de esta especie animal se han encontrado los ooquistes. En 1984 identificaron por primera vez la enfermedad en seis cachorros de perro, en tanto que la descripción del nuevo género y especie de protozoo fue hecha en 1988, lo cual fue confirmado en 1999. Sin embargo, el perro también puede ser hospedero intermediario, al igual que una serie de otras especies animales, entre las que se mencionan a: bovinos, equinos, ovinos, caprinos y especies animales silvestres (coyotes, ciervos, zorros, búfalos y camellos), sin olvidar la reciente descripción de las aves de corral como un tipo de hospedero más.

Así también, pero experimentalmente, se ha podido infectar a felinos, ratas, ratones, cerdos y monos. De igual forma existen diferentes estudios en los cuales se ha encontrado serología positiva a *Neospora* en ciertos animales salvajes, como el zorro de Chiloé, el león y en animales marinos. En todos ellos la infección natural ocurre por el consumo de ooquistes esporulados, los que contaminan los alimentos y las aguas, generando en el hospedero intermediario intracelularmente las otras dos formas del parásito, taquizoitos y quistes tisulares (bradizoitos). En cuanto a su distribución tisular, lo conocido hasta la fecha, indica una predilección del protozoo por tejido del sistema nervioso central, incluida la retina. Los tres estadios de *N. caninum*, taquizoitos, bradizoitos y ooquistes, pueden estar involucrados en la transmisión del parásito. La infección en el perro ocurre por el consumo de bradizoitos y taquizoitos, contenidos en los tejidos de las especies hospederas intermediarias. La prepatencia aproximada de esta parasitosis es de 5 días y la patencia puede abarcar de 7 a 19 días, en tanto los ooquistes son eliminados sin esporular y una vez en el medio externo, al cabo de 24 horas, esporulan cuando las condiciones son óptimas. Para completar el ciclo, estos ooquistes que contaminan las aguas y los alimentos, deben ser consumidos por sus hospederos intermediarios. *N. caninum* también puede ser transmitida de la madre al feto (vía placentaria, congénita o vertical) en bovinos, ovinos, caprinos, ratones, perros, gatos, monos y cerdos. El mecanismo de la transmisión congénita, ya sea primaria o una infección congénita repetida, es aún desconocido. (Retamal et al., 2010, p. 200).

En las diferentes especies, una vez ingresado el agente a una determinada población, la principal vía de propagación y mantenimiento de la infección es la transplacentaria, no existiendo la transmisión entre adultos. Una vez que un bovino se infecta al ingerir pasturas o raciones contaminadas, el mismo quedará muy probablemente infectado de por vida, sin sufrir

sintomatología alguna, pero podrá transmitir la infección por vía transplacentaria a sus sucesivas crías. No existen reportes hasta el momento de transmisión por semen o embriones. (Repiso et al., 2005, p. 17).

2.11 Hospedadores

El *N. caninum* tiene un amplio espectro de hospedadores domésticos y silvestres. La infección se ha descrito, en el perro, en el ganado bovino, en la cabra, la oveja, el caballo, búfalo de agua, el camello, la liebre parda europea y los camélidos sudamericanos. En animales silvestres, la infección ha sido detectada en el ciervo, el antílope, el mapache, el coyote, el zorro, el dingo, felinos salvajes y el rinoceronte. Por su parte, la infección experimental se ha llevado a cabo en el ratón, la rata, el gerbo, el gato, el perro, el coyote, el zorro, la vaca, la oveja; el cerdo, el macaco y en diversas especies de pájaros. El papel de cada una de estas especies hospedadoras en el ciclo biológico de parásito y su importancia en relación con la transmisión de la infección no es del todo conocido. (Pérez, 2004, p. 8).

Antes del descubrimiento de que los perros son huéspedes definitivos de *N. caninum*, se analizó algunas aves ampliamente distribuidas para determinar su papel potencial como huéspedes definitivos del parásito. Nueve aves carnívoras de cuatro especies, incluidos dos halcones de cola roja, dos buitres, dos lechuzas de campanario y tres cuervos americanos, fueron inoculados por vía oral con tejidos infectados con *N. caninum* de ratas y ratones. No se detectaron ooquistes de neospora en las heces de ninguna de las aves analizadas. Tres palomas domésticas y pinzones cebras, que son miembros de los órdenes columbiformes y passeriformes respectivamente los cuales están ampliamente distribuidos, fueron inoculados con taquizoítos de *N. caninum*; en las tres palomas se indujo la infección, pero los pinzones resistieron la infección. Estos resultados no prueban que las palomas sean huéspedes intermediarios naturales,

pero su susceptibilidad a la infección inducida proporciona una justificación artificial para investigar aves silvestres para determinar si pueden servir como huéspedes intermediarios. (Gondim, 2006, p. 250).

Según De Craeye et al. (2011) “*Neospora caninum* tiene una amplia gama de huéspedes intermedios de sangre caliente, pero este parásito no infecta a los humanos, aunque hay evidencias de que podría ocurrir” (p. 64).

2.12 Signos clínicos.

En esta especie animal, los signos clínicos asociados a esta parasitosis son similares a los encontrados en otra enfermedad protozoaria, cual es la toxoplasmosis. Sin embargo, en la neosporosis se describe un predominio de anomalías musculares y neurológicas, existiendo presentaciones inusuales, como por ejemplo de dermatitis. Los cachorros y los perros más viejos son los que pueden ser afectados, sin embargo, la mayoría de los casos clínicos, siendo los más severos, corresponden a perros jóvenes infectados congénitamente. Así por ejemplo en perros adultos, se han descrito signos multifocales del sistema nervioso central, polimiositis, miocarditis y dermatitis, en tanto que en perros jóvenes o cachorros se han presentado signos de parálisis ascendente, siendo los miembros posteriores los más severamente afectados. Otras disfunciones descritas en perros jóvenes incluyen disfagia, parálisis de la mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e incluso falla cardíaca. En cuanto a lesiones es posible observar focos multifocales de necrosis y mineralización en músculos, especialmente en el diafragma. Existe además hepatomegalia, neumonía y signos de malacia en el sistema nervioso central. (Retamal et al., 2010, p. 202).

Signos clínicos en cachorros (dependen del órgano afectado).

- Paresia que progresa a parálisis en el tercio posterior (hiperextensión de extremidades posteriores).
- Disfagia, parálisis mandibular, flacidez/atrofia muscular e insuficiencia cardiaca.
- Los casos más graves se observan en cachorros con infección congénita. (Miró y Carithers, 2012, p. 25).

2.13 Diagnóstico

El diagnóstico en la especie canina se basa en la sinología clínica y en las lesiones encontradas en los órganos afectados. Es posible además realizar un análisis de bioquímica sanguínea, el cual revela el aumento de aquellas enzimas séricas asociadas con necrosis de miocitos y daño hepático. La investigación de anticuerpos séricos anti *N. caninum* puede ser una buena herramienta diagnóstica, pero esto debe ser asociado al cuadro clínico, pues individuos clínicamente sanos pueden también presentar títulos de anticuerpos. Se ha empleado Inmunofluorescencia indirecta, como prueba diagnóstica, sin embargo, debe ser verificado histológicamente e intentar el aislamiento del parásito. Los ooquistes de *N. caninum* son morfológicamente similares a los de *Toxoplasma gondii* y *Hammondi hammondia* en heces de gato, y se asemejan a los ooquistes de *H. heydorni* en las heces de perro. (Retamal et al., 2010, p. 205).

En general el diagnóstico de *N. caninum* se realiza por medio de diferentes técnicas:

- Histopatológicas: a partir de fetos abortados o animales con sintomatología neuromuscular, siendo los órganos de elección para el estudio el cerebro, corazón, lengua e hígado. Se tiñen con hematoxilina-eosina (HE) y se confirman las formas parasitarias por Inmunohistoquímica (IHQ).

- Serológicas: por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y de ELISA se pueden detectar anticuerpos anti *Neospora* en suero de las diferentes especies o en líquido pleural de fetos abortados.

- Aislamiento: por inoculación de materiales presuntamente infectados en launchas. (Repiso et al., 2005, p. 18).

En bovinos, el examen del feto es necesario para un diagnóstico definitivo de neosporosis. Idealmente, se debe enviar el feto completo y fluidos corporales o suero sanguíneo para evaluación serológica, pero si esto no es posible, se deben enviar muestras de cerebro, corazón, y el hígado deben examinarse en busca de cambios histopatológicos, aunque la infección por *N. caninum* puede causar lesiones en varios órganos, el cerebro fetal es el tejido más afectado. La lesión más característica es la encefalitis focal caracterizada por necrosis e inflamación no supurativa. (Dubey, 1999, p. 353).

Los ensayos serológicos son herramientas de diagnóstico útiles para evaluar animales en busca de evidencia de exposición a *N. caninum*, y las técnicas pueden aplicarse ante mortem o post mortem en sueros y otros fluidos biológicos. Los estudios en ganado han demostrado que los anticuerpos específicos de *N. caninum* pueden fluctuar durante el embarazo y pueden caer por debajo de los niveles detectables. Además, los animales infectados no siempre desarrollan una respuesta de anticuerpos detectable. A pesar de sus limitaciones, los estudios serológicos han proporcionado pruebas contundentes de exposición a *N. caninum*. Las pruebas serológicas más utilizadas son el ensayo competitivo ligado a enzimas inmuno absorbentes (ELISA competitivo) y prueba de aglutinación de *N. caninum* (NAT) porque estas técnicas no requieren

el uso de especies anticuerpos secundarios específicos. (Donahoe, Lindsay, Krockenberger, Phalen, y Slapeta, 2015, p. 232).

2.14 Pronóstico

Si no se trata, los perros con neosporosis clínica habitualmente mueren. El pronóstico con el tratamiento es variable y dependiente de la edad del paciente. Los cachorros tienen un peor pronóstico que los perros adultos y, a menudo, muestran poca mejoría o mueren a pesar del tratamiento agresivo. La mejoría clínica es escasa si hay contractura muscular o parálisis. El pronóstico para los perros que presentan afectación neurológica crónica usualmente es la defunción del animal. Los cachorros mayores a 16 semanas de edad y los adultos responden mejor al tratamiento, pero el pronóstico general sigue siendo reservado, porque el tratamiento suele ser a largo plazo y puede no favorable. (Lyon, 2010, p. 4).

2.15 Tratamiento

Si bien muchos perros con neosporosis mueren, algunos han sobrevivido después del tratamiento con trimetoprim-sulfadiazina combinada con pirimetamina; un tratamiento secuencial con clorhidrato de clindamicina, trimetoprim-sulfadiazina y pirimetamina; o clindamicina sola. La velocidad de absorción de la clindamicina en perros es rápida después de la administración oral y es comparable con las tasas de absorción después de las inyecciones intramusculares y subcutáneas. Por lo tanto, el propietario puede administrar la terapia en el hogar si el paciente está lo suficientemente estable como para ser dado de alta y el propietario está dispuesto a brindar cuidados de apoyo durante el tratamiento. Se recomendó la administración de trimetoprim-sulfadiazina (15 mg/kg, por vía oral, cada 12 horas) con pirimetamina (1 mg/kg, vía oral, cada 24 horas) durante 4 semanas o clindamicina (10 mg/kg, vía oral, cada 8 horas) durante 4 semanas para el tratamiento de la neosporosis canina. En un

estudio reciente de cachorros de beagle infectados de forma natural, la administración de clindamicina sola (75 mg de clindamicina a las 9 semanas de edad, por vía oral, cada 12 horas [la dosis se duplicó a las 13 semanas de edad] durante 6 meses) redujo los signos clínicos de la enfermedad, pero no eliminó la infección. Si se produce una mejoría clínica lenta, el tratamiento debe continuarse más allá de la duración mínima recomendada. Se trató a un cachorro durante 18 semanas antes de que desaparecieran los signos clínicos. El tratamiento de los perros clínicamente afectados debe iniciarse antes del desarrollo de la rigidez extensora, si es posible. Además de la terapia médica, la fisioterapia, como los ejercicios pasivos de amplitud de movimiento y los masajes en casos de afectación neuromuscular, también pueden ser beneficiosas para la recuperación a largo plazo. (Lyon, 2010, p. 3).

Se suelen usar diversos fármacos, entre ellos la clindamicina y trimetoprim-sulfamidas en combinación con pirimetamina. El principal fármaco de uso es la clindamicina ya que la trimetoprim-sulfamidas se ha mostrado poco activa e ineficiente en el caso de pacientes gestantes. En el caso del bovino un tratamiento farmacológico no es económicamente rentable. Se administraría por largos periodos de tiempo produciendo así residuos en la producción del animal sea carne o leche. La vacuna contra *N. caninum* se ha presentado poco eficiente ayudando parcialmente en la reducción de abortos, pero no en la prevención de infecciones fetales o placentarias. (Pèrez y Rojas, 2021, p. 240).

2.16 Prevención

Existe un vínculo epidemiológico entre los perros y el ganado, por lo que se deben hacer esfuerzos para reducir la contaminación fecal canina de los piensos para el ganado, y no se debe permitir que los perros ingieran placentas bovinas. Alimentar a los perros con otras carnes crudas también es un factor de riesgo y debe evitarse si es posible. El comportamiento de caza

de los perros debe restringirse para evitar el contacto con huéspedes intermediarios salvajes. Las perras que paren cachorros clínicamente afectados no deben reproducirse debido al riesgo de infecciones transplacentarias repetidas. Si es posible, no se deben administrar glucocorticoides ni otros tratamientos inmunosupresores a perros seropositivos porque existe la posibilidad de que se active la infección. (Lyon, 2010, p. 4).

2.17 Parásitos que pueden causar abortos en Bovinos

La fertilidad del rebaño es uno de los factores más importantes desde el punto de vista de la economía ganadera. Especial importancia tienen los procesos morbosos que interfieren con la reproducción. Desde el punto de vista de las infecciones parasitarias, la patología de la reproducción se puede agrupar en:

- Parasitosis específicas del área genital y del feto, entre las que se encuentran la tricomoniasis, la toxoplasmosis y la neosporosis.
- Parasitosis no específicas que, ocasionalmente, pueden producir trastornos semejantes a los del grupo anterior como la sarcosporidiosis.
- Parasitosis de otros sistemas y aparatos pero que interfieren con la función reproductora normal de los animales, como ocurre con muchas helmintosis y algunas parasitosis sistémicas entre las que caber citar las piroplasmosis. (Mañes y Rojo, 2013, p. 145).

2.18 Incidencia en Bovinos.

La seropositividad en los rebaños puede ser elevada, aunque varía ampliamente y en un estudio se ha demostrado una seroprevalencia en los rebaños del 7 al 70%. Dentro de los rebaños es mayor la tasa de seropositividad en las vacas que abortan que en las que no presentan esta complicación. El aborto puede ser epizootico o esporádico. En el aborto epizootico, el número

de vacas que lo sufren es variable. Generalmente, la proporción oscila entre el 5 y el 10%, aunque pueden abortar hasta el 33% de las vacas en un corto periodo de tiempo. La duración del periodo de aborto puede ser una de las pocas semanas o varios meses. No existe una incidencia estacional importante, y el aborto tiene lugar en las vacas de carne y de leche. (Radostits, Gay, Blood, y Hinchcliff, 2002, p. 1553).

2.19 Transmisión en Bovinos

La tasa de transmisión vertical varía de unos rebaños a otros, con cifras que oscilan entre el 37% y el 62%. Una de las formas de medir la infección congénita es el análisis del suero precalostrado. En ausencia de una infección activa los anticuerpos adquiridos a través del calostro descienden con el tiempo dependiendo del título en el calostro.

Por otra parte, los valores de seroprevalencia aumentan con la edad de los animales, desde cifras del 10% en animales de 1-2 años hasta el 25% en vacas de 3 o más años, con independencia de la aptitud de los rebaños. (Mañes y Rojo, 2013, p. 152).

2.20 Patogenia en Bovinos

El microorganismo tiene predilección por el epitelio corial fetal y por los vasos sanguíneos de la placenta, causando vasculitis fetal e inflamación y degeneración del corion con necrosis difusa del lecho placentario. Los taquizoitos se introducen en las células del huésped y quedan localizados en una vacuola parasitaria. Se pueden observar en macrófagos, monocitos, células cerebrales de los animales infectados. En los casos de afectación neuromuscular las neuronas cerebrales y medulares están infectadas. La muerte celular se debe a la multiplicación activa de los taquizoitos. (Radostits et al., 2002, p. 1554).

2.21 Síntomas en Bovinos

La presencia de taquizoitos es más frecuente en abortos de poca edad mientras que los quistes suelen encontrarse en mayor número en los terneros nacidos muertos o en animales sacrificados antes de los 7 días de vida. Se ha observado que *Neospora* puede ocasionar muerte y retención o reabsorción fetal y, en determinadas circunstancias, sólo el esqueleto o el feto momificado es abortado o retenido hasta el final de la gestación. La momificación es uno de los hallazgos clínicos que suele observarse con alguna frecuencia en los abortos debidos a *Neospora*. En terneros afectados que nacen vivos, las principales manifestaciones son de tipo neuromuscular. Los primeros signos clínicos se observan entre los 3-5 días después del parto, aunque pueden aparecer incluso transcurridas dos semanas. Los terneros pueden con poco peso, débiles e incapaces de levantarse por la rigidez de las extremidades. (Mañes y Rojo, 2013, p. 146).

Las vacas infectadas muestran una disminución en la producción de leche durante la primera lactancia, produciendo aproximadamente 1 litro menos de leche/vaca/día que las vacas no infectadas, además de que pueden presentar aborto precoz.

En las vacas de carne la enfermedad se asocia a partos prematuros de terneras vivas y con bajo peso al nacer. Según el grado de prematuridad, estas terneras pueden mantenerse con vida si se aplican medidas intensivas de soporte.

La infección congénita también se puede manifestar ocasionalmente mediante ataxia, pérdida de la propiocepción consciente, parálisis y otros déficits neurológicos en las terneras recién nacidas, aunque la mayor parte de las terneras con infección congénita son clínicamente normales; además, de manera sorprendente, en los estudios epidemiológicos se ha sugerido que

la infección congénita no necesariamente produce un efecto perjudicial sobre la salud de la ternera o sobre su supervivencia. (Radostitset al., 2002, p. 1554)

2.22 Diagnóstico en Bovinos

El diagnóstico de la neosporosis congénita en terneros con signos neurológicos requiere un enfoque completo, puesto que los métodos de diagnóstico disponibles actualmente tienen un valor limitado. Estos casos clínicos son muy infrecuentes ya que la gran mayoría de los terneros infectados congénitamente nacen normales.

No es fácil establecer una relación causa-efecto entre abortos y la infección por *N. caninum* porque las infecciones congénitas asintomáticas son frecuentes y constatar la presencia del parásito o ADN del parásito no significa que *N. caninum* sea responsable del aborto.

El estudio *post mortem* y de cortes histológicos de cerebro, corazón e hígado, fijados con formol y procesados para pruebas histopatológicas e inmunohistoquímica rutinarias, constituyen métodos idóneos para el diagnóstico.

Para la detección de anticuerpos en el suero se puede recurrir a la inmunofluorescencia indirecta para ello se utilizan taquizoitos de *N. caninum* en cultivos celulares en un medio enriquecido con suero equino. Se considera que el suero es positivo si todo el cuerpo de los taquizoitos presenta fluorescencia.

Para estimar la prevalencia de las infecciones en un rebaño se puede realizar serología en tanques de leche, pero, aunque es un procedimiento económico, no es tan adecuado como para la detección de anticuerpos en el suero.

Es conveniente tener en cuenta que los anticuerpos y el recuento de glóbulos blancos pueden oscilar durante la gestación, incluso en animales que no han abortado, y algunos pueden ser negativos serológicamente. El tipo de anticuerpos que detectan puede variar con la situación clínica, en la mayoría de los animales abortados predominan las IgG₂ mientras que es lo que no abortan pueden predominar tanto las IgG₁ como las IgG₂.

Para la diferenciación entre vacas que han abortado y las que han parido normalmente se ha demostrado la utilidad de la técnica de ELISA basada en la utilización de la proteína NcGRA7. (Mañes y Rojo, 2013, pp. 150, 151).

2.23 Factores de riesgo en Bovinos

A menudo los brotes de aborto parecen deberse a infecciones puntuales, aunque los factores de riesgo son desconocidos. En los casos de sospecha de infección puntual, en los rebaños de vacuno de leche la enfermedad parece a menudo de manera epizootica, con abortos múltiples en un periodo de 1-2 meses. En la mayor parte de los casos los fetos con autólisis intensa son abortados al 5° - 7° mes de gestación, aunque en algunas ocasiones el aborto tiene lugar antes y el microorganismo se ha asociado a brotes en los que la edad del aborto ha oscilado entre 3 y 8.5 meses. Las vacas más jóvenes pueden presentar un aborto más precoz durante el embarazo que las vacas de mayor edad.

El aborto endémico se asocia con mayor frecuencia a la presencia de vacas con infección congénita en el rebaño; estas vacas muestran un riesgo elevado de aborto, sobre todo durante la gestación inicial y en la gestación que tiene lugar durante la primera lactancia. Las vacas que han abortado presentan un riesgo mayor de aborto en las gestaciones posteriores, pero este riesgo

disminuye con cada gestación. La verdadera frecuencia de los abortos repetidos es desconocida debido a que las vacas pueden ser eliminadas del rebaño. (Radostits et al., 2002, p. 1554).

2.24 Pérdidas ocasionadas por la neosporosis en Bovinos

La infección por *N. caninum* produce trastornos graves tanto en los bovinos como en el perro y en otras especies animales. La infección es frecuente pero no suele haber manifestaciones clínicas, aunque depende de la cepa de *N. caninum*. Los aislados procedentes de distintos hospedadores son similares, aunque muchas cepas tienen características propias, según se desprende de estudios moleculares. Esas particularidades tienen importancia epidemiológica, como se ha constatado en diversos estudios de algunos países europeos.

Sin embargo, no se conoce bien la variabilidad de las cepas en relación con su virulencia. Experimentalmente, se ha comprobado que el comportamiento *in vitro* de algunas cepas es diferente y que unas son más virulentas para el ratón que otras, aunque se desconoce si esas diferencias se repiten en otras especies de hospedadores.

También de forma experimental se han efectuado infecciones en vacas con cepas de distinta procedencia. En alguno de esos estudios, se ha comprobado que ciertos aislados no producen lesiones en el feto a pesar de que las vacas se infectaron al comienzo de la gestación; sin embargo, en bovinos de carne, la infección a los tres meses y medio de gestación puede producir muerte fetal.

Las repercusiones más importantes de la neosporosis son directas y se deben a fallos reproductivos, a lo que hay que añadir los costes debido a la atención veterinaria y los gastos relacionados con el diagnóstico, descenso de la producción de leche y los ocasionados por la reposición de las vacas que han abortado y son eliminadas del rebaño.

El diagnóstico de la neosporosis es difícil y caro. No es fácil cuantificar las pérdidas posnatales por neosporosis que, excluidas las pérdidas por muerte fetal, no hay otros efectos patológicos. Aunque, en rebaños lecheros, la eliminación de animales constituye un importante capítulo de pérdidas económicas por la dificultad de controlar la expulsión de fetos en el primer trimestre de gestación.

Las medidas paliativas para reducir las consecuencias de la infección por *N. caninum* en los bovinos consisten en:

- Transferencia embrionaria.
- Inseminación artificial de vacas seropositivas con semen de aptitud cárnica.
- Eliminación de animales.
- Quimioterapia y vacunación. (Mañes y Rojo, 2013, pp. 152, 153).

2.25 Hallazgos de necropsias

Radostits, Gay, Blood, y Hinchcliff (2002) afirman que: “La principal alteración macroscópica es la autólisis. Las lesiones histopatológicas son encefalitis multifocal, miocarditis y hepatitis periportal. Las lesiones hepáticas pueden ser más prominentes en los abortos epizoóticos” (p. 1555).

2.26 Extracción de sangre

Los análisis hematológicos suele ser imprescindible para llegar a un diagnóstico o para la monitorización de los pacientes. La recogida, la conservación y el envío se deben hacer correctamente, de otro modo los resultados serán imprecisos y no fiables. (Juste de Santa-Ana y Carretón, 2015, p. 21).

La sangre se obtiene usualmente por venopunción. En el perro se utilizan la vena safena, cefálica y yugular. En el gato es más abordable la vena femoral. Excepcionalmente (animales muy pequeños) puede intentarse la vía intracardíaca. En roedores se recomienda la vía retroorbitaria. Para la obtención de sangre arterial deberá punzarse la arteria femoral. Para algunas determinaciones exigen escasa cantidad de muestra (hematocrito, frotis), la sangre puede obtenerse a partir de una incisión en la piel (sangre capilar). (Coppo, 2015, p. 46).

Usar una aguja del calibre más grande posible para que la sangre fluya mejor y reducir la hemolisis. El tamaño de la jeringa depende de la cantidad de sangre requerida para el análisis. La aguja y la jeringa deben ser estériles y estar secas; si están sucias contaminarán la muestra; si están mojadas producirán hemólisis.

Conectar la jeringa y la aguja asépticamente. El bisel de la aguja debe quedar hacia arriba, en línea con la graduación de la jeringa, para poder ver la cantidad de sangre obtenida. Para el gato el calibre de la aguja debe ser 21G y para el perro de 20G ó 21G.

La yugular es la mejor opción en perros y gatos, pero también se puede utilizar la cefálica y la safena lateral. En general, la calidad de las muestras obtenidas de venas mayores es mejor. La vena cefálica está indicada para muestras pequeñas de pacientes grandes. El clínico deberá ver la vena bajo la piel, o sentirla claramente, y estabilizarla antes de introducir la aguja. Con la práctica. Si no aparece sangre en el primer intento, la aguja debe dejarse inmóvil en la fascia subcutánea, y, después de redefinir la situación de la vena, introducirla directamente en ella.

La congelación se utiliza para algunas pruebas sanguíneas no rutinarias como la determinación de los niveles de hormonas. A -10°C las muestras se conservan durante una semana pero a temperaturas más bajas (-15°C hasta -20°C) se conservan indefinidamente .

La obtencion y manipulacion descuidada o incorrecta de la muestra de sangre puede dañar las membranas celulares, causando una hemólisis de los glóbulos rojos y una ruptura y deformación de los glóbulos blancos, que hará la muestra inservible. (Juste de Santa-Ana y Carretón, 2015, pp. 23, 24).

2.27 ELISA

2.27.1 Principio de Elisa

- Se adhieren anticuerpos contra el antígeno específico que se quiere detectar a una membrana o pocillo.
- Se añade sangre al pocillo y todo el antígeno presente en la misma se unirá a los anticuerpos.
- La sangre se retira, excepto el antígeno, que se ha unido permanentemente.
- Se añade un conjugado (anticuerpo anti-antígeno unido a una enzima) que se une al antígeno que se encuentra en el pocillo.
- Después de lavar por segunda vez, el conjugado queda fijo al antígeno del pocillo.
- Por último, se añade un sustrato que cambia de color cuando entra en contacto con la enzima del conjugado. (Juste de Santa-Ana y Carretón, 2015, p. 242).

2.27.2 Tipos de ELISA

ELISA directo: 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 (pocillo). Luego se hace un lavado para eliminar todo lo que no se haya unido al soporte. Posteriormente, se agrega el anticuerpo específico conjugado con la enzima, el cual se unirá al antígeno si éste se adsorbió

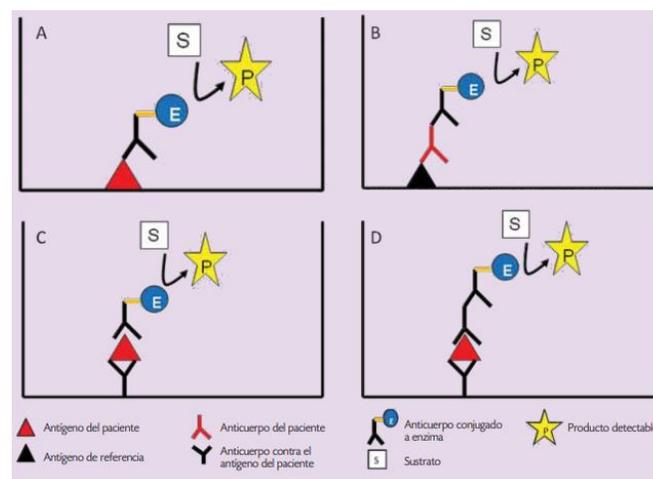
al soporte en el paso anterior. Luego de una segunda fase de lavado, en la que se elimina todo el conjugado que no se unió, se agrega el sustrato incoloro y éste es transformado en un producto detectable, si el conjugado todavía estaba presente (figura 2A).

ELISA indirecto: 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. En el primer paso, se agrega la muestra del paciente, y si el anticuerpo está presente, se unirá al antígeno que ya estaba adherido al soporte. Luego se hace un lavado para eliminar todo lo que no se haya unido al antígeno y, posteriormente, se agrega un anticuerpo antiinmunoglobulina humana conjugado con una enzima, el cual se unirá al anticuerpo, solo si está presente en la muestra del paciente. Luego de una segunda fase de lavado, en la que se elimina todo el conjugado que no se unió, se agrega el sustrato incoloro y éste es transformado en un producto detectable, si el conjugado todavía estaba presente (figura 2B).

ELISA de sándwich: 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. Posteriormente se agrega un segundo anticuerpo conjugado con una enzima, que se une específicamente al antígeno de interés, pero en un epítipo distinto al que se unió el anticuerpo que estuvo unido al soporte (primer anticuerpo). Luego de una segunda fase de lavado, en la que se elimina todo el conjugado que no se unió, se agrega el sustrato incoloro y éste se transforma en un producto detectable si el conjugado todavía estaba presente (figura 2C). A esta forma descrita también se le conoce como ELISA de sándwich directo. Existe otra variante de la técnica, conocida como ELISA de

sándwich indirecto. En la variante indirecta se utilizan tres anticuerpos, debido a que el segundo anticuerpo específico contra el antígeno no está directamente conjugado a la enzima, sino que se utiliza un tercer anticuerpo antiinmunoglobulina humana, que sí está conjugado con la enzima para que se una al segundo anticuerpo. Es decir, lo que en el ELISA de sándwich directo es logrado mediante el segundo anticuerpo, en el ELISA de sándwich indirecto se logra por medio del segundo y del tercer anticuerpo (figura 2D). El ELISA de sándwich indirecto tiene la ventaja de usar un mismo conjugado (anticuerpo antiinmunoglobulina humana conjugado con una enzima) para todas las pruebas de detección en las que se aplique la metodología, debido a que el anticuerpo con especificidad por el antígeno buscado en la prueba no es el que está unido a la enzima. De esta manera, se evita el costoso proceso de tener que conjugar a la enzima con cada anticuerpo específico, según el antígeno que se esté buscando en la prueba. (Ríos, Mercadillo, Yuil, y Castro, 2012, p. 213, 214).

Figura 2: Tipos de ELISA.



A) ELISA Directo, B) ELISA Indirecto, C) ELISA de sandwich directo, D) ELISA de sándwich indirecto. Fuente (ELISA and its applications in Dermatology, 2012).

Elisa Directa:

- Se añade el antígeno a la fase sólida y se absorbe pasivamente en incubación.
- Después de la incubación, cualquier antígeno no unido se elimina por lavado dejando la fase sólida recubierta.
- Los anticuerpos específicos para el antígeno se han marcado con una enzima (conjugado) se agregan y se incuban.
- El conjugado se une con el antígeno en fase sólida. Cualquier conjugado no unido (libre) se elimina por lavado.
- Una solución de sustrato / cromóforo se añade y la enzima cataliza la reacción para dar un producto de color.

El antígeno se une a la fase sólida mediante absorción pasiva. Después del lavado, es marcado con la enzima y se añaden anticuerpos. Después de un período de incubación y el lavado, al procedimiento se añade el sustrato y permitiendo así el desarrollo de color. El antígeno se diluye en un tampón (estadio I), comúnmente un pH alto (9,6) carbonato o bicarbonato de amortiguación o pH neutral; tampón de fosfato en solución salina (PBS). La clave es que el tampón no contenga otras proteínas que podrían competir con el antígeno diana para su unión a la fase sólida en el plástico. Los antígenos son principalmente proteínas en su naturaleza y se adjuntará a la forma pasiva al plástico durante un período de incubación. La temperatura y el tiempo de incubación no son tan importantes, pero la normalización de las condiciones es de vital importancia, y el uso de las incubadoras a 37 °C es la óptima (ya que está ampliamente disponible en los laboratorios). Después de la incubación, cualquier antígeno en exceso se elimina, por un paso de lavado simple (fase II), llenando y vaciando los pozos, utilizando una solución tampón neutro (por ejemplo, PBS). Los anticuerpos conjugados con la enzima, se

añade (fase III), y se dirigen específicamente contra sitios antigénicos en la fase obligada del sólido y reactivo. Los anticuerpos conjugados se diluyen en un tampón, el cual contiene una sustancia que inhibe la absorción pasiva de proteínas, pero que aún permite la unión inmunológica. En la incubación, los anticuerpos se unen al antígeno. Una vez más, un paso simple lavado se utiliza para eliminar anticuerpos no unidos (estadio IV). La V etapa consiste en la adición de un sustrato adecuado o sustrato/cromógena combinación de la enzima en particular unido a los anticuerpos. El objetivo es permitir el desarrollo de una reacción de color a través de la catálisis enzimática. La reacción permite el progreso por un período definido, después del cual la reacción se detiene (fase VI) mediante la alteración del pH del sistema, o mediante la adición de un reactivo de la inhibición. Por último, el color se cuantifica mediante el uso de un espectrofotómetro de lectura (etapa VII) en el momento adecuado longitud de onda para el color producido.

ELISA Indirecta: Las etapas I y II son similares a los del sistema directo. Fase III consiste en la adición de la marcación de detección de anticuerpos, que se diluyen en un tampón para impedir la adhesión no específica de las proteínas en el suero de la fase sólida (el amortiguador de bloqueo). Esto es seguido por la incubación y lavado del exceso (no ligado) a los anticuerpos, para alcanzar determinados vinculantes (estadio IV). Etapa V es la adición del conjugado (marcado con la enzima), especies de anticuerpos, diluido en tampón de bloqueo, una vez más seguido de la incubación y el lavado. Después de lograr la unión del conjugado (fase VI). Se añade el Sustrato/cromóforo al conjugado unido (fase VII) y el color se desarrolla, luego se realiza la parada (etapa VIII) y se lee (etapa IX) en un espectrofotómetro. El sistema indirecto es similar al sistema ELISA directa en que el antígeno está conectado directamente a la fase sólida y es seguida por adición de anticuerpos (detección de anticuerpos). Sin embargo, estos

añadidos anticuerpos no están marcados con la enzima, pero se están conduciendo por los anticuerpos relacionados con la enzima. Estos anticuerpos son producidos contra las inmunoglobulinas de la especie en la que se detectan y se producen los anticuerpos, estos reciben el nombre de conjugados de anti-especie. Por lo tanto, si la detección de anticuerpos se produce en conejos, la enzima marcada con anticuerpos tendría que ser anti-conejo Igs en la naturaleza. Esto permite una gran flexibilidad en el uso de especies anti-conjugados en que diferentes especificidades de conjugado. Se puede utilizar en particular para detectar la unión de inmunoglobulina en el ensayo, y hay literalmente miles de conjugados disponibles comercialmente. Por ejemplo, el conjugado anti-especie podría ser antiIgM, anti-IgG 1, IgG anti-2, y así sucesivamente. El sistema indirecto ofrece la ventaja de que cualquier número de antisueros pueden ser examinadas por la unión a un antígeno determinado, utilizando un solo conjugado anti-especie. Estos sistemas han sido fuertemente explotados en aplicaciones de diagnóstico, sobre todo cuando se examina (cribado) un gran número de muestras. Uno de los problemas que estos sistemas tienen es el mayor o menor grado de unión no específica en sueros individuales. Esto tiende a aumentar la dispersión (variabilidad) en los resultados del ensayo y, por tanto, aumenta la necesidad de procesar muchos sueros para evaluar la confianza. (Maya, 2011, pp. 44, 45, 46).

ELISA sándwich:

Se puede dividir en dos sistemas, que han sido nombrado como ELISA sándwich directa y ELISA sándwich indirecta.

ELISA sándwich directa: Implica la unión pasiva de anticuerpos a la fase sólida (estadios I y II). Esta es una (captura de anticuerpos), entonces se unen al antígeno (s) que se agregan en la

etapa III. El antígeno (s) se diluyen en un tampón de bloqueo para evitar el apego inespecífico a la fase sólida. En este caso, los componentes del tampón de bloqueo no deben contener antígenos que podrían unirse a los anticuerpos de captura. Después de la incubación y el lavado, un anticuerpo complejo se une con el antígeno en la fase sólida (etapa IV). El antígeno capturado (a veces conocido como atrapado) es detectado por la suma y la incubación de la enzima marcada y de los anticuerpos específicos en el tampón de bloqueo (fase V). Por lo tanto, se trata de conjugar la unión directa con los objetivos antigénicos en la captura antigénica. Este segundo anticuerpo puede ser la misma que la utilizada para la captura, o ser diferentes en términos de origen animal específico o especies en las que se ha producido. Después de la incubación y el lavado (fase VI), la enzima ligada es desarrollada por la adición de sustrato/cromógeno (fase VII), luego se detuvo (etapa VIII), y finalmente lee mediante un espectrofotómetro (etapa IX). Este sistema explota a los anticuerpos unidos a una fase sólida a la captura de antígeno. El antígeno es detectado utilizando suero específico para el antígeno. El anticuerpo está marcado con enzima para su detección. El anticuerpo de captura y el anticuerpo de detección puede ser el mismo suero o de diferentes animales de la misma especie o de diferentes las especies. El antígeno debe tener al menos dos sitios antigénicos diferentes.

ELISA sándwich Indirecto: Las fases I-IV son muy similares a sándwich directo. Por lo tanto, los anticuerpos son pasivamente unidos a la fase sólida y el antígeno (s) es capturado. Sin embargo, la etapa v implica la adición un detector de anticuerpos. En este caso, los anticuerpos no están marcados con la enzima. Después de la incubación y el lavado (fase VI), la detección de anticuerpos se realiza mediante la adición y la incubación con un conjugado enzimático anti-especies (fase VII). El conjugado unido luego es procesado como se describe en los otros sistemas. La ventaja de este ensayo es que cualquier número de diferentes fuentes de anticuerpos

(muestras) se pueden añadir al retrato del antígeno, una condición en la que la especie en que se ha producido no sea el mismo que el anticuerpo de captura. Más específicamente, la enzima conjugada anti-especie de anticuerpo no reacciona con los anticuerpos que utiliza para capturar el antígeno. Es posible utilizar la misma especie de anticuerpos si las técnicas de inmunoquímica se utilizan para seleccionar y producir formas particulares de anticuerpos y con la atención y la especificidad del conjugado de enzima utilizado. El antígeno es capturado por un anticuerpo en fase sólida. El antígeno se detecta con el uso de anticuerpos de otra especie. Esto a su vez está requerido por un conjugado antiespecie. De este modo, la especie de suero para el recubrimiento y la detección de anticuerpos deben ser diferentes; el conjugado antiespecie no puede reaccionar con los anticuerpos de recubrimiento. (Maya, 2011, pP. 49, 50, 51, 52, 53, 54).

2.28 Resumen del estado del arte del estudio del problema.

La baja en la producción en el sector ganadero, ha impulsado líneas de investigación que se enfoquen en detectar el factor que provoca la misma. Ante ello diferentes países han desarrollado políticas de Investigación y desarrollo que se han centrado en descubrir la o las causas, llegando a manifestar que una de esas “deficiencias” se debe a la existencia de parásitos y bacterias.

Uno de ellos es el parásito conocido como “*Neospora caninum*”; el mismo que ha encontrado un excelente huésped como lo es la raza canina sin excepción. Este particular se convierte en un serio problema para el sector ganadero de nuestro país, debido que la gente que se dedica al cuidado de los mismos tiene como cultura, el utilizar a razas caninas como apoyo para cumplir con estas tareas.

En las parroquias rurales del cantón Cuenca estos canes son llevados de la ciudad al campo o viceversa, lo que fomenta la propagación del virus en un área urbana como rural. Por lo tanto, es imprescindible realizar investigaciones puntuales que determinen la prevalencia del parásito en las diferentes zonas del cantón, ya que no existe un soporte histórico de la existencia del mismo.

El desarrollo investigativo del presente trabajo consistirá en establecer la prevalencia del virus en diferentes parroquias del cantón Cuenca a través de métodos de campo como la recolección de muestras de sangre y la determinación de la prevalencia mediante procesos de laboratorio para lo cual emplearemos las instalaciones de la Universidad Politécnica Salesiana.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

3.1.1 Materiales de oficina

Tabla 1. *Materiales de Oficina.*

Descripción	Unidad	Cantidad
Cuaderno	u	1
Bolígrafo	u	2
Cámara digital	u	1
Computadora	u	1
Memoria USB	u	1
Impresora	u	1
Resma papel bond A4	u	1
Carpeta	u	1

3.1.2 Materiales de campo

Tabla 2. *Materiales de campo.*

Descripción	Unidad	Cantidad
Caja mascarillas	u	1
Mandil	u	1
Caja de guantes de examinación	u	1
Caja de cofias	u	1
Agujas Hipodérmicas amarillas	u	300
Tubos al vacío sin anticoagulante	u	300
Paquete de algodón	u	1
Alcohol	gl	1
Agua Oxigenada	gl	1

3.1.3 Materiales de laboratorio

Tabla 3. *Materiales de laboratorio.*

Descripción	Unidad	Cantidad
Pipeta de 1000 μ l	u	1
Pipeta de 10 μ l	u	1
Puntas azules	u	300
Puntas amarillas	u	300
Viales eppendorf	u	300
Gradillas	u	3
Multicanal de 12 puntas de 300 μ l	u	1
Equipo Lector de ELISA	u	1

3.1.4 Materiales químicos

Tabla 4. *Materiales químicos.*

Descripción	Unidad	Cantidad
Agua destilada	ml	475
Solución de Parada (0.5 M)	ml	27.9
Solución de Revelación (TMB)	ml	27.9
Control Positivo	μl	20
Control Negativo	μl	20
Solución de Lavado Concentrado (20X)	ml	25
Conjugado Concentrado (10X)	ml	3
Microplacas sensibilizadas con extracto purificado de <i>Neospora caninum</i>	Tira	35
Diluyente 14	ml	25.11
Diluyente 12	ml	27

3.1.5 Materiales Biológicos

Tabla 5. *Materiales Biológicos.*

Descripción	Unidad	Cantidad
Caninos (Paciente)	u	279
Suero Sanguíneo	ml	1.5

3.2 Metodología

El método empleado corresponde a un proceso epidemiológico de tipo descriptivo, prospectivo de corte transversal; el mismo que permitirá determinar la presencia de anticuerpos para el agente etiológico y se calculará la prevalencia de la enfermedad en un momento establecido.

3.3 Análisis Estadístico

Para cumplir con este propósito se empleó un procedimiento de tipo exploratorio, ya que no existen censos de la población canina a nivel de las parroquias del cantón Cuenca; el método consistió en hacer un muestreo no probabilístico.

3.4 Población y Muestra

Para realizar el cálculo de la muestra se utilizó la siguiente fórmula:

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

Dónde:

n = Tamaño de muestra buscado.

Z = Parámetro estadístico que depende del nivel de confianza (95%).

p = Probabilidad de que ocurra el evento estudiado (éxito).

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

e = Error de estimación máximo aceptado (5%). (Jaramillo y Martínez, 2010, p. 112).

De acuerdo a investigaciones realizadas previamente se tomaron las medias de prevalencia llegando a concluir lo siguiente. De 7 estudios se obtuvo la prevalencia media de 23.71%.

$$n = \frac{1.96^2 * 0.2371 * (1 - 0.2371)}{0.05^2}$$

$$n = 278$$

3.4.1 Procedimiento de campo

Las muestras sanguíneas fueron extraídas de la vena cefálica, mediante el uso de vacutainer, manteniendo las medidas de asepsia correspondientes. Se obtuvo 4 ml de sangre y se preservó en tubos de ensayo estériles sin anticoagulante, los cuales fueron rotulados previamente. Las muestras se conservaron a una temperatura entre 4°C y 7°C.

Las muestras fueron llevadas al laboratorio para obtener su suero a través del método de centrifugación; se calibró la centrifugadora a 3500 rpm durante 5 minutos; se extrajo el suero sanguíneo de todas las muestras con una micropipeta rotulada de 1000µl con puntas azules en viales eppendorf y se sometió a congelación para su preservación

3.4.2 Procedimiento de laboratorio

Para los procesos internos de laboratorio se aplicarán las instrucciones que se adjuntan al respecto; estas vienen en el Kit de ELISA ID Screen® Neospora caninum Competition – NCC Ver 0616 ES (Anexo 1).

3.4.2.1 Preparación de las muestras

Tomando las precauciones necesarias para evitar diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras, se preparó 3 grupos; 1 para animales de clínicas, 1 para animales de fincas y 1 para animales de albergues del cantón Cuenca, a cada grupo se le agregó 100 µL de suero de cada paciente para después correr la técnica de ELISA por incubación corta.

3.4.2.2 Preparación de la solución de lavado

Para este particular, se seguirá las recomendaciones que esta adjunta al Kit. Se realizó el proceso para la estabilización de 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.

De manera análoga se procede a preparar la Solución de Lavado (1X) diluyendo 1:20 la Solución de Lavado Concentrado (20X) en agua destilada.

3.4.2.3 Procedimiento de ensayo con incubación corta

Los reactivos estuvieron estabilizados dentro del rango recomendado (temperatura ambiente $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) antes del uso, paso seguido y mediante el uso de un “vortex” se procedió a su homogenización.

A) Reactivos utilizados:

- 50 μl de Diluyente 14 a cada pocillo.
- 5 μl de Control Positivo a los pocillos A1 y B1.
- 45 μl de Control Negativo a los pocillos C1 y D1.
- 50 μl de la muestra a ensayar en los pocillos restantes.

B) Se protege la placa y se procede a su incubación por un lapso de 45 min a una temperatura de 21°C .

C) A continuación, se vacía los pocillos y se lavan cada uno con 300 μl de solución de lavado; se repite este paso por 3 veces.

D) Se procede a preparar el Conjugado 1X haciendo una dilución 1:10 del Conjugado Concentrado 10X con el Diluyente 12.

E) 100 µl del Conjugado 1X es agregado a cada pocillo.

F) Se protege la placa y se procede a la incubación por 30 min a una temperatura de 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$).

G) Luego se vacían los pocillos y se lavan cada uno con 300 µl de solución de lavado; se repite este paso por 3 veces. Debe evitarse el secado de los pocillos durante el proceso de lavados.

H) Se agrega 100 µl de la Solución de Revelación a cada pocillo.

I) Se protege la placa y se procede a la incubación por 15 min a 21°C ($\pm 5^\circ\text{C}$) en un entorno libre de luz.

J) Se procede a distribuir 100 µl de Solución de Parada a cada pocillo, para frenar la reacción.

K) A continuación, en el espectrofotómetro se procede a leer los datos de la densidad óptica (DO) de 450 nm.

Para la correcta interpretación de los resultados obtenidos, se recomienda realizar una revisión del método empleado; de esa manera, se exponen los valores obtenidos:

- Validación:

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

$$DO_{CN} > 0.700$$

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.

$$\frac{DO_{CP}}{DO_{CN}} < 0.3$$

- Interpretación

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

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

Dónde:

DO = Densidad óptica.

$_{CN}$ = Control negativo

S/N% = Muestra al positivo.

Las muestras que presentan un S/N% (tomado del Anexo 3):

(< ó = 50%) se interpretan como positivas.

(> 50 y < ó = 60 %) se interpretan como dudosas.

(> 60%) se interpretan como negativas.

Para el análisis de los datos se emplea el programa ID Soft™, a través del cual se obtienen los diferentes parámetros de criterios de evaluación y valores S/P del kit.

3.5 Variables de estudio

3.5.1 Variables Independientes: Suero sanguíneo de caninos

Tabla 6. *Variables Independientes.*

Concepto	Categoría	Indicadores	Índice
Unidad experimental que nos facilitara los marcadores.	Físico	Machos	Numérico
		Hembras	Numérico
	Biológico.	Cantidad de suero	Mi
		Positivo	Numérico
		Negativo	Numérico

3.5.2 Variables Dependientes: ELISA competitivo para *Neospora caninum*

Tabla 7. *Variables Dependientes.*

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

3.6 Consideraciones Éticas

Es importante tanto, la protección del paciente durante el proceso de toma de muestras; para lo cual se regirá pegado a la normativa que se demanda 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 (GAD Cantonal de Cuenca, 2016, p. 18), y reza:

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.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Prevalencia de *Neospora caninum* en caninos

Para la obtención de los resultados, así como para su validación e interpretación, se utilizó el “Kit de ELISA” ID Screen®, *Neospora caninum* Competition; el mismo que contiene los reactivos químicos para la detección de la presencia del parásito en los pacientes a través de una muestra de su sangre. Los resultados obtenidos en laboratorio y su validación se indican en la tabla 8.

Tabla 8. *Prevalencia total: Albergues, Clínicas y Fincas del cantón Cuenca.*

Cualidad	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
DUDOSO	4	1,43 %	0,39 %	3,63 %
NEGATIVO	269	96,42 %	93,51 %	98,27 %
POSITIVO	6	2,15 %	0,79 %	4,62 %
Total	279	100,00 %		

A continuación, se agruparán los datos en categorías como edad, procedencia, raza y sexo:

La edad se categorizó de la siguiente manera:

- Cachorros (animales que van desde el nacimiento hasta el año de edad).
- Adultos (animales que van desde 1 año con 1 mes hasta los 9 años).
- Geriátrico (animales que van desde los 9 años en adelante).

Tabla 9. *Prevalencia por edad, “Dudoso”.*

Edad	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
ADULTO	2	50,00 %	6,76 %	93,24 %
CACHORRO	1	25,00 %	0,63 %	80,59 %
GERIÁTRICO	1	25,00 %	0,63 %	80,59 %
Total	4	100,00 %		

Tabla 10. *Prevalencia por edad, “Positivo”*

Edad	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
ADULTO	6	100,00 %	54,07 %	100,00 %
CACHORRO	0	0,00 %	0,00 %	45,93 %
GERIÁTRICO	0	0,00 %	0,00 %	45,93 %
Total	6	100,00 %		

Tabla 11. *Prevalencia por procedencia, “Dudoso”.*

Procedencia	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
ALBERGUE	1	25,00 %	0,63 %	80,59 %
CLÍNICA	2	50,00 %	6,76 %	93,24 %
FINCA	1	25,00 %	0,63 %	80,59 %
Total	4	100,00 %		

Tabla 12. *Prevalencia por procedencia, "Positivo"*.

Procedencia	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
ALBERGUE	2	33,33 %	4,33 %	77,72 %
CLÍNICA	1	16,67 %	0,42 %	64,12 %
FINCA	3	50,00 %	11,81 %	88,19 %
Total	6	100,00 %		

Tabla 13. *Prevalencia por raza, "Dudoso"*.

Raza	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
FRENCH POODLE	1	25,00 %	0,63 %	80,59 %
FRENCH TOY	1	25,00 %	0,63 %	80,59 %
MESTIZO	2	50,00 %	6,76 %	93,24 %
Total	4	100,00 %		

Tabla 14. *Prevalencia por raza, "Positivo"*.

Raza	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
FRENCH POODLE	1	16,67 %	0,42 %	64,12 %
MESTIZO	5	83,33 %	35,88 %	99,58 %
Total	6	100,00 %		

Tabla 15. Prevalencia por sexo, "Dudoso".

Sexo	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
HEMBRA	2	50,00 %	6,76 %	93,24 %
MACHO	2	50,00 %	6,76 %	93,24 %
Total	4	100,00 %		

Tabla 16. Prevalencia por sexo, "Positivo".

Sexo	Frecuencia	Prevalencia	LI 95%	LS 95%
HEMBRA	2	33,33 %	4,33 %	77,72 %
MACHO	4	66,67 %	22,28 %	95,67 %
Total	6	100,00 %		

Comparando esta realidad en cuanto a la prevalencia del parásito *Neospora caninum*, en la Provincia del Azuay, se encuentra a niveles mínimos; característica que permite sugerir un ambiente saludable para el sector ganadero de las zonas involucradas.

4.2 Discusión.

En un estudio realizado al suroriente del Estado de México, 2021 en el cual se analizaron 146 sueros de zonas urbanas y rurales dieron como resultado que: 75 individuos mostraron reacción positiva a *Neospora caninum*, por lo que la identificación de anticuerpos específicos en los perros bajo estudio fue de 51.3%, la seroprevalencia en perros de la zona urbana fue del 48.6% (34/70) y para la zona rural del 53.9% (41/76), no encontrando diferencia estadística ($p=0.314$). Los títulos de anticuerpos anti-*Neospora caninum* fueron: 66.7% (50/75) con 1:50,

10.7% (8/75) con 1:200, 9.3% (7/75) con 1:400 y 13.3% (10/75) con 1:800. A pesar de que se identificó una mayor seroprevalencia en machos 55.9% (47/84) en comparación con las hembras 45.1% (28/62), no hubo diferencia estadística significativa entre los géneros de la zona urbana y rural ($p=0.131$). (García et al., 2022).

Dicho estudio se podría extrapolar al panorama de los “Albergues” ya que este sería un intermedio entre animales urbanos y rurales, interpretándose que la prevalencia positiva es del orden del 33,33% (2/6) por lo que su tendencia es menor; y este puede deberse a que de alguna manera se aplica un plan de saneamiento para las mascotas caninas o que los animales rescatados mantienen una prevalencia baja.

Otro estudio realizado en 2016, en la ciudad de João Pessoa, Paraíba, noreste de Brasil en el cual establecieron la presencia de *N. caninum* en muestras de sangre de 384 perros que fueron atendidos en 34 clínicas veterinarias dieron como resultado que: Seis perros (1,6 %) fueron positivos para *N. caninum*, con títulos de 50 a 200. (Brasil et al., 2018).

Resultados que varían a los obtenidos en esta investigación ya que se obtuvo una prevalencia del 16.67% (1/6), estos cambios pueden ocasionarse ya que la población muestreada fue mayor a la analizada; pero en ambos casos hay una prevalencia mínima.

Con respecto a “Clínicas”, se puede afirmar que la probabilidad de propagación y/o contaminación, esta minimizada debido a que son mascotas cuyos dueños si se sujetan a un plan preventivo de salud animal.

Con el mismo énfasis se realizó otra investigación en 2015, en fincas del cantón Mejía, Ecuador, en el cual comprobaron la presencia de *N. caninum* en relación canino-bovino, se muestrearon un total de 100 vacas y 40 perros pertenecientes a haciendas, dando como resultado:

- El 100% de los caninos muestreados eran mestizos.
- Del total de los 40 caninos muestreados, el 55% eran machos y el 45% eran hembras. De este total el 20% eran cachorros y el 80% adultos.
- De los 40 caninos, el 7,5% eran hembras cachorras, el 12,5% eran machos cachorros, el 37,5% eran hembras adultas y el 42,5% eran machos adultos.
- El 100% de los caninos viven en la hacienda, conviven de cerca con los bovinos y defecan en las pasturas o agua que consume el ganado.
- Del 100% de los caninos el 60% si ha consumido productos de aborto bovino y el 40% no lo ha hecho.

Los resultados obtenidos en caninos por medio de la prueba IFI fueron los siguientes: 26 caninos resultaron positivos a *Neospora caninum* y 14 caninos resultaron negativos. Es decir que el 65% resulto positivo y el 35% resulto negativo a *Neospora caninum*. (Yucaza, 2015).

Concordando con resultados obtenidos en los cuales las fincas muestreadas dieron el mayor porcentaje de prevalencia positiva ante el parásito, en el orden de un 50% (3/6), así mismo siendo los más afectados los perros machos mestizos.

En el estudio publicado en el 2010 acerca de la Prevalencia de *Neospora caninum* en perros pastores de una empresa ganadera de la sierra sur del Perú, se muestrearon 122 caninos, de los cuales 102 era machos y 20 eran hembras de los cuales 16 machos y 2 hembras resultaron ser positivos ante la presencia del parásito, dando una prevalencia de 15.7% y 10% respectivamente. (Vega, Chávez, Falcón, Casas y Puray, 2010). En los resultados obtenidos con relación al sexo de los caninos se determinó que; el 66,67% (4/6) de los infectados eran machos y el 33,33% eran hembras. Los resultados difieren ya que ese estudio fue realizado en una zona específica

como es una empresa, la cual deberá de regirse por normas de salubridad adecuadas para reducir al mínimo las posibles pérdidas.

En un estudio realizado en la provincia de Buenos Aires, Argentina en el 2016, en el cual se analizaron 987 muestras de suero canino provenientes de áreas urbanas y sin signos clínicos asociados, remitidos al Servicio de Diagnóstico de Toxoplasmosis y Neosporosis del Laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Ciencias Veterinarias se obtuvo los siguientes resultados: Los porcentajes para el caso de la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* fueron: menores de 1 año 15,3% (28/183), entre 1 y 5 años 22,4% (89/398) y en mayores a 5 años 30,5% (124/406). Según el análisis de chi cuadrado, se encontraron diferencias significativas entre los rangos de edad para ambas enfermedades. (Gos, 2016).

Los resultados obtenidos arrojan como resultado que el 100% (6/6) de los animales adultos dieron positivo, resultado que puede variar puesto que esto se define por el criterio del investigador al organizar los resultados en edades, en este estudio se clasifico como:

Por otro lado, en 2021 una investigación realizada, en la Provincia del Azuay y en cantones separados geográficamente, determina una prevalencia positiva del 4.54% en el cantón Sta. Isabel en general. (Criollo, 2021).

En cuanto a la prevalencia positiva general obtenido en este estudio es del 2,15%, los cuales difieren mínimamente, estos ligeros cambios pueden deberse al clima, la ubicación geográfica de ambos y el nivel de explotación ganadera.

5. Conclusiones y recomendaciones.

5.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos a partir del suero sanguíneo nos dieron como conclusión que solo el 2.15% de los individuos muestreados dieron positivo a *Neospora caninum*, lo cual no es representativo, por lo que se puede decir que el parásito no es aún un problema en el cantón Cuenca.

Con las diferentes tablas se puede observar que la mayor parte de los animales parasitados son perros mestizos machos provenientes de fincas, los mismos considerados adultos, esta tendencia se debe a que la mayor parte de los ganaderos tienden a dejar a los caninos en compañía del ganado para que los “cuiden”, prefiriendo en especial a los machos por su agresividad.

5.2 Recomendaciones

La carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Politécnica Salesiana, debe informar a las autoridades locales a nivel de gobierno en cuanto al ámbito de Protección del medio ambiente y desarrollo del agro; estas investigaciones con el objeto de desarrollar políticas y planes de mitigación que permitan minimizar los daños que este parásito provoca; así como el impacto en el desarrollo socioeconómico del sector ganadero.

Así también, se recomienda difundir esta información a los propietarios de Fincas; en cuanto a la tenencia de animales caninos; en cuanto a la propagación del parásito y sus consecuencias.

Se establezca un acuerdo con el sector ganadero para que por medio de los estudiantes de la carrera apoyen a mitigar la propagación de parásito en el sector con el fin de conseguir mejoras en cuanto a la producción y conservación de una buena salud del ganado.

Para los resultados “dudosos” se sugiere realizar de nuevo el estudio mediante el Kit de “ELISA”.

Mantener un adecuado manejo de las muestras manteniendo siempre la cadena de frío para evitar alteraciones en los resultados.

6. Bibliografía

Almería, S. (2013). Neospora caninum and wildlife. *International Scholarly Research Notices*, 2013(1), 1-23. Obtenido de <https://downloads.hindawi.com/archive/2013/947347.pdf>

Álvarez, G. (2003). *Identificación y caracterización de antígenos de "Neospora caninum" con interés inmunodiagnóstico en bovinos* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/4780/>

Bermeo, H. (2010). *Proyecto: DIPECHO VII "IMPLEMENTACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE VULNERABILIDADES A NIVEL CANTONAL"*. Obtenido de Academia:

https://www.academia.edu/34837918/Proyecto_DIPECHO_VII_IMPLEMENTACION_DE_ANALISIS_DE_VULNERABILIDADES_A_NIVEL_CANTONAL_CUENCA

Brasil, A., Parentoni, R., Silva, J., Santos, C., Mota, R., & Azevedo, S. (2018). Risk factors and anti-Toxoplasma gondii and Neospora caninum antibody occurrence in dogs in João Pessoa, Paraíba state, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27(2), 242-247. Obtenido de <https://www.scielo.br/j/rbpv/a/Qmfk9pVcMCYNKZM6G3TV38G/?format=html&lang=en#>

Collantes, E. (2006). *PATOGENIA DE LA NEOSPOROSIS EN EL FETO* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/5393/>

Coppo, J. (2015). *Intrepretación de análisis clínicos en perros y gatos*. Salta, Argentina: Eucasa.

Obtenido de

https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/lc/bibliotecaups/titulos/185786?fs_q=Perros&fs_bisac_id=1961;1964;2210;1824;2206;2212&fs_bisac_id_lb=MEDICINA__%2F__Medicina__veterinaria__%2F__General;MEDICINA__%2F__Medicina__veterinaria__%2F__Animales__peque%C3%B1

Criollo, N. (2021). *PREVALENCIA DE NEOSPORA CANINUM EN CANINOS (Canis lupus familiaris) MEDIANTE EL MÉTODO DE ELISA COMPETITIVO* (Tesis de Pregrado).

Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca. Obtenido de

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/21362/1/UPS-CT009390.pdf>

De Craeye, S., Speybroeck, N., Ajzenberg, D., Dardé, M., Collinet, F., Tavernier, P., . . . Dierick, K. (2011). Toxoplasma gondii and Neospora caninum in wildlife: common parasites in Belgian foxes and Cervidae? *Veterinary Parasitology*, 178(1-2), 64-69. Obtenido de

<https://www.sciensano.be/sites/default/files/1-s2.0-s0304401710007235-main.pdf>

Donahoe, S., Lindsay, S., Krockenberger, M., Phalen, D., & Slapeta, J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of Neospora caninum infection in wildlife.

International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 4(2), 216-238. Obtenido

de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213224415000188>

Dubey, J. (1999). Recent advances in Neospora and neosporosis. *Veterinary parasitology*, 84(3-4), 349-367. Obtenido de <https://pubag.nal.usda.gov/download/24868/pdf>

- Dubey, J. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology*, 41(1), 1-16. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2717477/>
- Dubey, J., Schares, G., & Ortega-Mora, L. (2007). Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(2), 323-367. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865591/>
- GAD Cantonal de Cuenca. (2016). *ORDENANZA PARA EL CONTROL Y MANEJO DE LA FAUNA URBANA Y LA PROTECCIÓN DE ANIMALES DOMÉSTICOS DE COMPAÑÍA DEL CANTÓN CUENCA*. Obtenido de Cuenca Alcaldía: <https://www.cuenca.gob.ec/content/ordenanza-para-el-control-y-manejo-de-la-fauna-urbana-y-la-protecci%C3%B3n-de-animales-dom%C3%A9sticos>
- García, V., Espinosa, E., Hernández, P., Flores, E., Reyes, R., & Ojeda, J. (2022). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en perros rurales y urbanos del suroriente del Estado de México. *Abanico Veterinario*, 12(1), 1-12. Obtenido de <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/article/view/18/23>
- Gondim, L. (2006). *Neospora caninum* in wildlife. *TRENDS in Parasitology*, 22(6), 247-252. Obtenido de <http://people.se.cmich.edu/gehri1tm/bio%20597p%20wildlife%20diseases/readings/gondim%202006.pdf>
- Gos, M. (2016). *Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii y anti-Neospora caninum en sueros caninos de la provincia de Buenos Aires mediante las*

técnicas de inmunofluorescencia indirecta y aglutinación directa (Tesis Doctoral).

Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina. Obtenido de

[http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/56164/Documento_completo.pdf-](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/56164/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=4&isAllowed=y)

[PDFA.pdf?sequence=4&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/56164/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=4&isAllowed=y)

Gutiérrez, J., Ortuño, A., Castellá, J., & Almeria de Merced, S. (2006). *Parasitología Clínica:*

Parasitosis digestivas del perro y del gato. Barcelona, España: Multimédica Ediciones

Veterinarias.

Hugues, B., Cabazas, I., & Torres, M. (2020). *Crianza y salud caninas*. Habana, Cuba: Editorial

Universitaria.

Obtenido

de

<https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/lc/bibliotecaups/titulos/171333>

Jaramillo, C., & Martínez, J. (2010). *Epidemiología veterinaria*. México: El Manual Moderno.

Juste de Santa-Ana, C., & Carretón, E. (2015). *Fundamentos de Análisis Clínicos en animales*

de compañía. Barcelona, España: Multimédica Ediciones Veterinarias.

King, J., Jenkins, D., Ellis, J., Fleming, P., Windsor, P., & Šlapeta, J. (2011). Implications of

wild dog ecology on the sylvatic and domestic life cycle of *Neospora caninum* in

Australia. *The Veterinary Journal*, 188(1), 24-33. Obtenido de

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023310000857>

Linares, G. (2018). La domesticación del perro y sus orígenes. *Sociedad de Estudios*

Historiológicos y Etnográficos, 13(1), 42-49. Obtenido de

[https://www.researchgate.net/publication/331313716_LA_DOMESTICACION_DEL-](https://www.researchgate.net/publication/331313716_LA_DOMESTICACION_DEL_PERRO_Y_SUS_ORIGENES)

[PERRO_Y_SUS_ORIGENES](https://www.researchgate.net/publication/331313716_LA_DOMESTICACION_DEL_PERRO_Y_SUS_ORIGENES)

- 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. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428097001.pdf>
- Lyon, C. (2010). Update on the Diagnosis and Management of *Neospora caninum* Infections in Dogs. *Topics in Companion Animal Medicine*, 25(3), 1-8. Obtenido de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:2247/docview/1030255060?accountid=32861>
- Mañes, A., & Rojo, F. (2013). *60 Q&A sobre parasitología bovina*. Zaragoza, España: Grupo Asis Biomedica S.L.
- Maya, A. (2011). *ELABORACIÓN DEL MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE ENSAYO POR INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)*. Universidad de Nariño, Colombia. Obtenido de <https://sired.udenar.edu.co/4062/1/85064.pdf>
- Miró, G., & Carithers, D. (2012). *Parásitos: atlas de información al propietario*. Zaragoza, España: Servet editorial - Grupo Asís Biomedica S.L. Obtenido de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/lc/bibliotecaups/titulos/59418>
- Moreno, B. (2003). *Higiene e inspección de carnes - II* (Vol. 2). Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos.
- New Skete, M. (2014). *Cómo ser el mejor amigo de su perro*. New York, USA: Paidotribo. Obtenido de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/lc/bibliotecaups/titulos/124429>

- Pérez, D., & Rojas, O. (2021). Neosporosis en caninos y bovinos. *Revista veterinaria*, 32(2), 328-241. Obtenido de <http://www.scielo.org.ar/pdf/revet/v32n2/1669-6840-revet-32-02-238.pdf>
- Pérez, F. (2004). *Variabilidad adaptativa y patogénica en Neospora caninum* (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/id/eprint/5362/1/T27453.pdf>
- Piaggio, J., Delucchi, L., Bañales, P., & Easton, C. (2007). *Actualización en neosporosis*. Montevideo, Uruguay: Udelar.CSEP. Obtenido de https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/20256/1/FVET_PiaggioJ_2007_Act.Neosporosis.PDF
- Radostits, O., Gay, C., Blood, D., & Hinchcliff, K. (2002). *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino* (Vol. 2). Madrid, España: McGraw-Hill - INTERAMERICANA.
- Reichel, M., McAllister, M., Pomroy, W., Campero, C., Ortega-Mora, L., & Ellis, J. (2014). Control options for *Neospora caninum*—is there anything new or are we going backwards? *Parasitology*, 141(11), 1455-1470. Obtenido de https://www.researchgate.net/profile/Carlos-Campero-2/publication/287459005_Control_measures/links/5681351008ae1975838f6ab7/Control-measures.pdf
- Repiso, M., Gil, A., Bañales, P., Fernández, L., Guarino, H., Herrera, B., . . . Silva, M. (2005). Prevalencia de las principales enfermedades infecciosas que afectan el comportamiento reproductivo en la ganadería de carne y caracterización de los establecimientos de cría

- del Uruguay. *Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay*, 40(157), 1-29. Obtenido de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/lc/bibliotecaups/titulos/83457>
- Retamal, P., Abalos, P., & Fredes, F. (2010). *Enfermedades animales producidas por agentes biológicos*. Santiago de Chile, Chile: Editorial Universitaria de Chile. Obtenido de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/lc/bibliotecaups/titulos/67678>
- Ríos, J., Mercadillo, P., Yuil, E., & Castro, M. (2012). ELISA and its applications in Dermatolog. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica.*, 10(3), 212-222. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2012/dcm123j.pdf>
- Rosell, F. (2018). *Un olfato para todo: los perros, los amigos más útiles del hombre*. Barcelona, España: Paidotribo. Obtenido de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:3488/es/lc/bibliotecaups/titulos/116881>
- Silva, P., Chavez, A., Rivera, H., & Casas, E. (2002). Seroprevalencia de Neospora caninum en Bovinos lecheros del valle de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 13(2), 51-55. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172002000200007&script=sci_arttext&tlng=en
- Suárez, C., & Maldonado, J. (2012). Seropositividad a Neospora caninum en unidades de producción bovina del estado Lara, Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 30(1), 35-41. Obtenido de https://web.archive.org/web/20180426064826id_/http://www.bioline.org.br/pdf?zt120

UranoLab. (12 de Diciembre de 2019). *Neosporosis*. Obtenido de UranoVet:
<https://www.uranovet.com/es/uranolab/fichas-clinicas-veterinarias/neosporosis>

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. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 21(1), 80-86. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v21n1/a12v21n1.pdf>

Yucaza, M. (2015). *DETERMINACIÓN DE NEOSPORA CANINUM EN EL CANTÓN MEJÍA: RELACIÓN CANINO – BOVINO* (Tesis de Pregrado). Universidad Central Del Ecuador, Quito, Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6676/1/T-UCE-0014-026.pdf>

7. ANEXOS

Anexo 1. Instructivo ID Screen® Neospora caninum Competition NCC ver 0616 ES

afao
Certified
management
system

ID.vet

ID Screen®

Neospora caninum Competition



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
Para uso *in vitro*

España
Nº de registro MAPA: 10154-RD

Colombia
Nº de registro ICA: 10526-BV

NCC ver 0616 ES

Producido por:
IDvet - Innovative Diagnostics, 310, rue Louis Pasteur – Grabels - FRANCE
Tel: +33 (0)4 67 41 49 33 - Fax: +33 (0)4 67 45 36 95
www.innovative-diagnostics.com - E-mail: info@innovative-diagnostics.com

Validación

El ensayo es validado si:

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

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

$$S/N\% = \frac{DO_{muestra}}{DO_{CN}} \times 100$$

Las muestras que presentan un S/N%:

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

Resultado	Interpretación
S/N% ≤ 50%	POSITIVO
50% < S/N% ≤ 60%	DUDOSO
S/N% > 60%	NEGATIVO

Nota: El programa para el análisis de datos ID Soft™, se encuentra disponible gratuitamente. Para mayor información, sírvase ponerse en contacto con support.software@innovative-diagnostics.com

Este programa informático permite calcular los diferentes parámetros del kit (criterios de validación, valores S/P o S/N, títulos, determinación de la edad de vacunación, grupos) y asimismo propone una síntesis gráfica de los perfiles serológicos de los animales analizados.

0012523

Page 4
NCC ver 0616 ES

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.

Descripción y Principio

Los pocillos están sensibilizados con un extracto purificado de *Neospora caninum*.

Las muestras y los controles por ensayar se añaden en los micro pocillos. 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 micro pocillos. 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, mediante lavados, se añade 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.

Componentes del Kit

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 (± 3°C).

2. Los otros reactivos pueden conservarse entre +2°C a +25°C.

3. Para conocer las condiciones detalladas de almacenamiento de los componentes abiertos y/o diluidos, consulte <https://www.id-vet.com/support/faq>.

4. Las soluciones de lavado y parada se pueden utilizar para toda la gama de productos IDvet. Las soluciones de revelación y los diluyentes con los mismos números de lote son intercambiables.

Materiales necesarios no incluidos

1. Micropipetas o pipetas multicanales dispensadoras de volúmenes de 10 µl, 100 µl y 500 µl.
2. Puntas desechables de pipetas.
3. Microplaca de pre-dilución de 96-pocillos.
4. Agua destilada o desionizada.
5. Lavador de placas (manual o automático).
6. Lector de microplacas de 96 pocillos.

Precauciones de uso

1. No pipetear con la boca.
2. Contiene componentes que pueden ser dañinos para la piel y los ojos y pueden causar sensibilización por contacto con la piel. Evitar el contacto con la piel y los ojos. Use bata protectora de laboratorio, guantes unidireccionales y gafas de seguridad. La solución de parada (ácido 0.5 M) puede ser dañina si se ingiere.
3. No exponer la solución de revelación a la luz o a agentes oxidantes.
4. Todos los desechos deben descontaminarse adecuadamente antes de su eliminación. Deseche de acuerdo con las regulaciones locales.

Consultar la Hoja de datos de seguridad del material disponible bajo pedido a info@innovative-diagnostics.com para obtener información más detallada.

Preparación de las muestras

Para evitar diferencias en los tiempos de incubación entre las muestras, es posible preparar 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.

Preparación de la solución de lavado

Si necesario, equilibrar la Solución de Lavado Concentrada (20X) a temperatura ambiente (21°C ± 5°C) y agitada bien hasta que la Solución Concentrada esté completamente solubilizada.

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. Asegúrese 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). Para obtener más información, consulte la "Guía de lavado de IDvet", disponible bajo pedido.

Procedimiento del ensayo

Permitir que todos los reactivos estén equilibrados a temperatura ambiente 21°C (± 5°C) antes de utilización. Homogenizarlos por medio de la inversión o utilizando un vortex.

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.
2. Cubrir la placa e incubar 45 min ± 4 min at 37°C (± 3°C).

Incubación nocturna

1. 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.
2. Cubrir la placa e incubar durante la noche (16-20 horas) a 21°C (± 5°C).

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.

Anexo 2. Registro de muestras

Procedencia: ALBERGUES

Pág. 1/1

MUESTRA	NOMBRE	RAZA	SEXO	EDAD	PREVALENCIA	
15	MATÍAS	GOLDEN	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	1
24	HOLLIE	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	2
59	COCO	PITBULL	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	3
70	MIA	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	4
85	PRÍNCIPE	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	5
91	NEGRO	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	6
92	BLANCA	FRENCH POODLE	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	7
96	PACO	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	POSITIVO	8
101	PEQUI	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	9
103	LUKI	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	10
110	CIELO	FRENCH POODLE	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	11
111	JACK III	PITBULL	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	12
112	YURI	FRENCH POODLE	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	13
117	TONY	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	14
122	POPEYE	PITBULL	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	15
126	LOBA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	16
130	PELUCHE	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	17
134	VALENTINA	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	18
135	OSA	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	19
137	MICKEY	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	20
139	COPO	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	21
140	MAX IV	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	22
141	JUANA	GOLDEN	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	23
145	MAXI II	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	24
146	TINA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	25
147	ANTONIO	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	26
148	PIPON	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	27
149	CUKY	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	28
150	MUÑECA	FRENCH POODLE	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	29
154	GARMY	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	DUDOSO	30
155	LUCERO	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	31
159	LUCY	MESTIZO	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	32
161	PANCHO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	33
164	HEIDY	CASTELLANO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	34
165	MAXI III	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	35
169	HALLY	MESTIZO	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	36
170	LOGAN	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	37
171	SHIZUKA	MESTIZO	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	38
181	CORTO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	39
182	PELUCHIN II	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	40
185	LUNA III	CASTELLANO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	41
186	JAGGO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	POSITIVO	42
190	NACHO	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	43
191	NEGRO	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	44
192	LUCKY III	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	45
193	PELIGROSO II	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	46
195	SAMY III	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	47
196	DINA	MESTIZO	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	48
197	PELUSA III	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	49
198	PAZ	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	50

					Pág. 2/1	
MUESTRA	NOMBRE	RAZA	SEXO	EDAD	PREVALENCIA	
199	TOGO	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	51
200	IWI	MESTIZO	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	52
201	MARQUITO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	53
202	OSO III	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	54
207	CHARLIE	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	55
208	NEGRITO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	56
209	OZUNA	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	57
210	CARAMELO II	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	58
211	SAMY IV	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	59
213	VALENTINA II	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	60
214	SEBASTIÁN	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	61
216	ZEUS	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	62
218	AZABACHE	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	63
221	CHARLOT	CASTELLANO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	64
222	JADYA	HUSKY SIBERIANO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	65
224	DANIEL	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	66
226	MANCHAS	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	67
227	SCOT	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	68
228	CARLOS	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	69
229	PANCHITO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	70
234	DEWY	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	71
235	PANCHITO II	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	72
237	BOBY	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	73
239	VENUS	SCHNAUZER	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	74
242	ANTONIO II	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	75
243	ZEUS	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	76
244	LUCKY IV	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	77
246	PETUNIA	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	78
254	BLANCO II	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	79
255	TITA	MESTIZO	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	80
256	DOCTOR	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	81
257	FIRULAIS	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	82
258	GISSELE	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	83
259	SR. BIGOTES	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	84
264	PELUCHIN III	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	85
265	BICHO	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	86
266	PELUCHIN IV	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	87
272	CALLEJERA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	88
273	MAXI IV	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	89
274	NEGRO	MESTIZO	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	90
276	MARCO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	91
277	LULITA	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	92
279	NANTU	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	93

RESULTADOS	
POSITIVO	2
NEGATIVO	90
DUDOSO	1
TOTAL	93

Procedencia: CLINICAS

Pág. 3/1

MUESTRA	NOMBRE	RAZA	SEXO	EDAD	PREVALENCIA	
2	POCHO	SHIH TZU	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	1
3	LUCKY	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	2
4	FEISAE	GALGO AFGANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	3
7	CANGUIL	FRENCH TOY	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	4
8	BIZCOCHO	SHIH TZU	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	5
10	BEKY	PEKINÉS	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	6
11	KIARA	SHIH TZU	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	7
13	VALE	SCHNAUZER	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	8
16	LALO	SHIH TZU	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	9
20	KENIA	AMERICAN BULLY	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	10
21	NACHO	SCHNAUZER	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	11
22	PULGA	CHIHUAHUA	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	12
23	BODKY	BULLDOG	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	13
25	PABLITO	PASTOR ALEMÁN	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	14
26	PETUNIA	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	15
30	PELUSA	FRENCH POODLE	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	16
31	SUSANA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	17
33	MAX	PEKINÉS	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	18
34	WALKER	GOLDEN	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	19
41	BELLA	MESTIZO	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	20
43	PININA	PEKINÉS	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	21
44	PUPIS	CHIHUAHUA	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	22
47	PINKY	FRENCH POODLE	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	23
48	PETER	BULLDOG FRANCÉS	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	24
49	KIRA	GOLDEN	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	25
50	VIOLETA	SCHNAUZER	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	26
51	CHUQUILLA	SCHNAUZER	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	27
52	HANNAH	SHAR PEI	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	28
56	KIARA II	SHIH TZU	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	29
57	PERLITA	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	30
60	LUDOVICO	SHAR PEI	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	31
61	DOKI	DÁLMATA	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	32
62	BABAHO	FRENCH POODLE	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	33
64	CHIQUITA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	34
71	JACK II	DÁLMATA	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	35
73	KILIAN	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	36
75	SAMY	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	37
77	AVECILLA	SCHNAUZER	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	38
78	SIMON II	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	39
79	KIKE	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	40
84	OLIVIA	SCHNAUZER	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	41
86	CARAMELO	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	42
88	LUNA II	MESTIZO	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	43
89	MARTINA	PEKINÉS	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	44
93	CUPER	GOLDEN	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	45
95	COQUI	COCKER SPANIEL INGLÉS	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	46
97	SAMANTA	SCHNAUZER	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	47
98	MILKA	LABRADOR RETRIEVER	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	48
104	NANI	FOX TERRIER	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	49
107	SASHA	BULLDOG	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	50
108	SANDY	COCKER SPANIEL INGLÉS	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	51
109	PATO	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	DUDOSO	52
115	LAYLA	PITBULL	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	53
119	PUG	PUG	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	54
120	ROCKY II	FOX TERRIER	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	55

MUESTRA	NOMBRE	RAZA	SEXO	EDAD	PREVALENCIA	
125	TURNA	FRENCH TOY	HEMBRA	ADULTO	DUDOSO	56
127	SKY	BEAGLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	57
132	SIMON III	SAN BERNARDO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	58
138	NAPO	PUG	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	59
142	COCO II	GOLDEN	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	60
143	CHELO	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	61
156	MOLLY	SHIH TZU	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	62
158	JOSEJO	SHIH TZU	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	63
162	SEÑORA FRANCISCA	SCHNAUZER	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	64
163	DOÑA BELLA	SCHNAUZER	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	65
166	AARON II	BEAGLE	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	66
168	BENITO	SHIH TZU	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	67
173	ÑUTA	SHIH TZU	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	68
175	CHIMUELO	PITBULL	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	69
176	MOLLIE	COCKER SPANIEL INGLÉS	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	70
178	TOMY	POMERANIA	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	71
179	EUGENIO	SHIH TZU	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	72
180	KELO	BULL TERRIER FRANCÉS	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	73
184	JOAQUÍN	SHIH TZU	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	74
203	EMILIA	PEKINÉS	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	75
204	TORO	PEKINÉS	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	76
206	POLAR	PEKINÉS	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	77
212	CHISPITA	PAPILLOM	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	78
215	LUNA IV	PEKINÉS	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	79
217	BOMBÓN	PEKINÉS	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	80
223	RICO	CHIHUAHUA	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	81
225	TOBY III	BEAGLE	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	82
236	PEPITO	BASSET HOUND	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	83
241	BENITO II	CHIHUAHUA	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	84
248	SHARIK	PEKINÉS	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	85
249	PONCHITO	PEKINÉS	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	86
250	JASHIN	SHIH TZU	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	87
253	BRUNO	SHIH TZU	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	88
260	TOBY IV	TECKEL	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	89
263	ROSE	PITBULL	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	90
268	SAMBA	SHIH TZU	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	91
269	LOLY	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	POSITIVO	92
271	PRINCESA II	SHIH TZU	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	93

RESULTADOS	
POSITIVO	1
NEGATIVO	90
DUDOSO	2
TOTAL	93

Procedencia: FINCAS

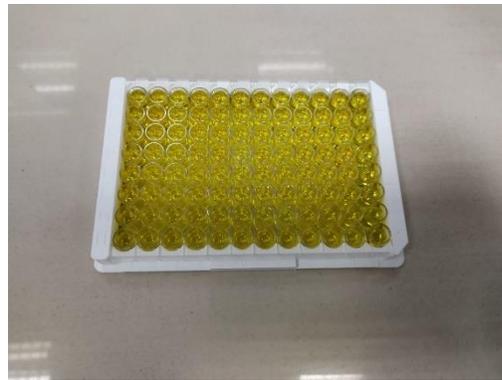
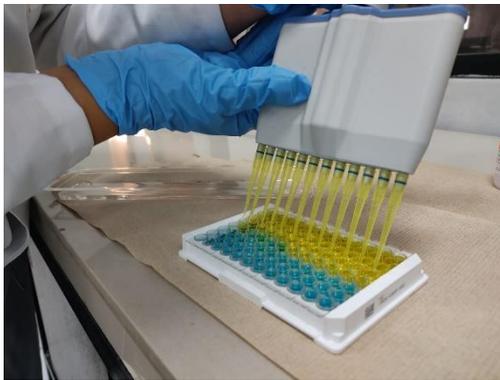
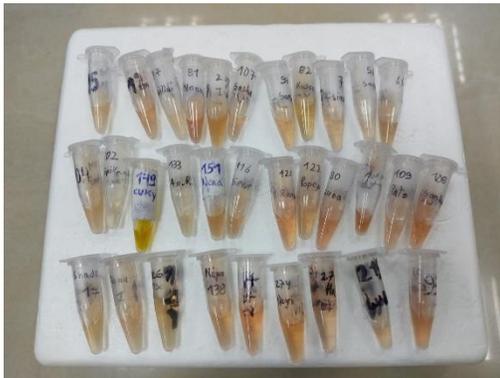
Pág.5/1

MUESTRA	NOMBRE	RAZA	SEXO	EDAD	PREVALENCIA	
1	TOMAS	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	1
5	LUCKY II	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	2
6	JUE	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	3
9	BLONDIE	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	4
12	PELUCHIN	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	5
14	SIMÓN	MESTIZO	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	6
17	SHADOW	GOLDEN	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	7
18	SHERIFF	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	8
19	DULCE	GOLDEN	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	9
27	ANNIE	HUSKY SIBERIANO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	10
28	OSO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	11
29	CHIQUILÍN	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	12
32	BEKY II	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	13
35	PELUSA II	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	14
36	CHIKI	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	POSITIVO	15
37	DANGER	DOBERMAN	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	16
38	BAMBI	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	17
39	BRUNO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	18
40	JACK	AKITA	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	19
42	NALA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	20
45	TOMASA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	21
46	ZIARA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	22
53	LUU	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	23
54	OSO II	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	24
55	ROCKY	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	25
58	SANSÓN	PITBULL	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	26
63	MAX II	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	27
65	TIRION	PASTOR ALEMÁN	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	28
66	LOGAN	HUSKY SIBERIANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	29
67	CECIL	FRENCH POODLE	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	30
68	RAMÓN	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	31
69	AARON	ROTTWEILER	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	32
72	AMBAR	CASTELLANO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	33
74	LINDA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	34
76	PELIGROSO	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	35
80	LUNA	MESTIZO	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	36
81	NENA	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	37
82	RUSSO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	38
83	TOBY	MESTIZO	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	39
87	CHUKY	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	40
90	PRINCESA	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	41
94	BOC	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	42
99	SCOT	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	43
100	POLET	MESTIZO	HEMBRA	GERIÁTRICO	DUDOSO	44
102	SPIKE	MESTIZO	MACHO	ADULTO	POSITIVO	45
105	PERLA	HUSKY SIBERIANO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	46
106	BLANCO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	47
113	SAMY II	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	48
114	APOLO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	49
116	SIMUR	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	50
118	COBITO	MESTIZO	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	51
121	CHIQUI	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	52
123	VICKY	FRENCH POODLE	HEMBRA	GERIÁTRICO	NEGATIVO	53
124	MAX III	PASTOR ALEMÁN	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	54
128	RAMBO	HUSKY SIBERIANO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	55

MUESTRA	NOMBRE	RAZA	SEXO	EDAD	PREVALENCIA	
129	KUMAI	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	56
131	BINGO	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	57
133	BENJI	PITBULL	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	58
136	MAXI	PASTOR ALEMÁN	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	59
144	TOMAS II	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	60
151	NENA II	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	61
152	LALA	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	62
153	BUGABU	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	63
157	CHICHI	MESTIZO	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	64
160	MANCHAS	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	65
167	RAMÓN II	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	66
172	MAX V	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	67
174	SIMON IV	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	68
177	MUÑECA II	MESTIZO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	69
183	GUSTAVO	HUSKY SIBERIANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	70
187	ZAMIRA	WEIMARANER	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	71
188	TOBY II	MESTIZO	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	72
189	BETO	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	73
194	SHIZUKA	DOBERMAN	HEMBRA	CACHORRO	NEGATIVO	74
205	MIA II	CASTELLANO	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	75
219	KLEIN	HUSKY SIBERIANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	76
220	COLE	HUSKY SIBERIANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	77
230	NICO	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	78
231	COFY	CASTELLANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	79
232	MONO	GOLDEN	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	80
233	BELLA II	FRENCH POODLE	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	81
238	BLUE	HUSKY SIBERIANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	82
240	CHARLI	HUSKY SIBERIANO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	83
245	BOMER	GOLDEN	MACHO	CACHORRO	NEGATIVO	84
247	COFY II	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	85
251	BODY	MESTIZO	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	86
252	TONY II	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	87
261	OSO IV	MESTIZO	MACHO	GERIÁTRICO	NEGATIVO	88
262	CHOCO	FRENCH POODLE	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	89
267	NICA	BULLDOG	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	90
270	QUICO	SCHNAUZER	MACHO	ADULTO	NEGATIVO	91
275	HAN	MESTIZO	MACHO	ADULTO	POSITIVO	92
278	SUKA	DOBERMAN	HEMBRA	ADULTO	NEGATIVO	93

RESULTADOS	
POSITIVO	3
NEGATIVO	89
DUDOSO	1
TOTAL	93

Anexo 3. Imágenes del trabajo experimental.



	1	2	3	4	5	6
A	0001	0009	0017	0025	0033	0041
B	0.751	1.860	2.071	1.210	1.626	1.713
C	0002	0010	0018	0026	0034	0042
D	0.914	1.590	1.630	2.012	1.790	1.553
E	0003	0011	0019	0027	0035	0043
F	2.355	1.707	1.646	0.028	2.362	1.748
G	0004	0012	0020	0028	0036	0044
H	2.138	1.859	1.567	1.808	1.564	1.638
I	0005	0013	0021	0029	0037	0045
J	1.920	1.709	1.443	1.452	1.781	1.630
K	0006	0014	0022	0030	0038	0046
L	1.887	1.809	1.659	1.672	1.556	1.404
M	0007	0015	0023	0031	0039	0047
N	1.632	1.636	1.581	1.696	1.882	1.508
O	0008	0016	0024	0032	0040	0048
P	1.792	1.453	1.674	1.416	0.719	1.948

7-12 >> Send Result Print Exit

	7	8	9	10	11	12
A	0049	0057	0065	0073	0081	0089
B	1.773	1.539	1.684	1.253	1.802	1.663
C	0050	0058	0066	0074	0082	0090
D	1.841	1.500	1.643	1.674	1.543	1.562
E	0051	0059	0067	0075	0083	0091
F	1.595	1.745	1.541	1.674	1.382	2.046
G	0052	0060	0068	0076	0084	0092
H	1.448	1.552	1.522	1.899	1.644	2.032
I	0053	0061	0069	0077	0085	0093
J	1.368	1.697	1.640	1.952	1.731	1.439
K	0054	0062	0070	0078	0086	0094
L	1.694	1.211	1.673	1.802	1.557	1.404
M	0055	0063	0071	0079	0087	0095
N	1.652	1.836	1.881	1.636	1.832	1.593
O	0056	0064	0072	0080	0088	0096
P	1.722	1.457	1.674	1.415	0.719	1.948

1-6 << Send Result Print Exit