



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE NEOSPOROSIS BOVINA E
IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE CANINOS COMO FACTOR DE
RIESGO EN LAS GANADERÍAS DEL CANTÓN LOJA”

*Tesis de Grado previa a la obtención
del Título de Médico Veterinario,
Zootecnista*

AUTOR

Jinsop Gerardo Cuenca Flores

DIRECTOR

Dr. José María Valarezo García, Mg. Sc.

LOJA- ECUADOR

1859
2014

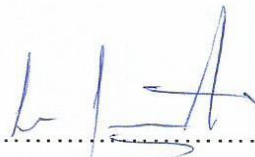
“DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE NEOSPOROSIS BOVINA E IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE CANINOS COMO FACTOR DE RIESGO EN LAS GANADERÍAS DEL CANTÓN LOJA”

Tesis presentada al Tribunal de Grado como requisito previo a la obtención del título de:

Médico Veterinario Zootecnista

Aprobada:

Dr. Alfonso Saraguro Martínez, Mg. Sc.
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



.....

Dr. José Eugenio Gaona, Mg. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



.....

Dr. Rolando Sisalima Jara, Mg.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



.....

CERTIFICACIÓN

Dr. José María Valarezo García, Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación denominado “**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE NEOSPOROSIS BOVINA E IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE CANINOS COMO FACTOR DE RIESGO EN LAS GANADERÍAS DEL CANTÓN LOJA**” realizado por el señor egresado **Jinsop Gerardo Cuenca Flores**, previo a la obtención del título de Médico Veterinario Zootecnista, ha sido dirigido y prolijamente revisado durante su ejecución, por lo tanto se autoriza su presentación para la calificación correspondiente

Loja, febrero del 2014



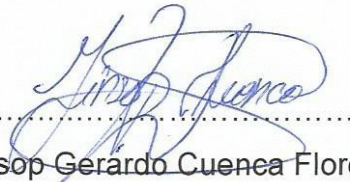
.....
Dr. José María Valarezo García, Mg. Sc.
DIRECTOR DE TESIS

Loja, febrero del 2014.

AUTORÍA

Yo, Jinsop Gerardo Cuenca Flores declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional- Biblioteca Virtual.



Jinsop Gerardo Cuenca Flores

C.I:1104557903

Autor

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DE EL AUTOR PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo, **Jinsop Gerardo Cuenca Flores**, declaro ser el autor de la tesis titulada: “**DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE NEOSPOROSIS BOVINA E IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE CANINOS COMO FACTOR DE RIESGO EN LAS GANADERÍAS DEL CANTÓN LOJA**”, como requisito para optar al grado de Médico Veterinario Zootecnista, autorizo al sistema bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera para el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la Universidad Nacional de Loja, a los dieciocho días del mes de febrero del dos mil catorce, firma el autor.

Firma: 

Autor: **Jinsop Gerardo Cuenca Flores**

Número de cédula: **114557903**

Dirección: **Provincia de Loja**

Correo electrónico: **jinyer25_@hotmail.com**

Teléfono celular: **0986442864**

Director de Tesis: **Dr. José María Valarezo García, Mg Sc.**

Tribunal de Grado: **Dr. Alfonso Saraguro Martínez, Mg. Sc.**

Dr. José Eugenio Gaona, Mg. Sc.

Dr. Rolando Sisalima Jara, Mg.

AGRADECIMIENTO

Agradezco primeramente a Dios, a mis Padres, Hermanos y demás familiares por su amor y por todo ese apoyo que siempre me han dado, porque gracias a ellos hoy soy lo que soy,

A la Universidad Nacional de Loja, al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, en particular a la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia por haberme enseñado valores que son muy importantes en el ser humano.

Al Sr. Dr. José María Valarezo García por su incondicional colaboración como Director de Tesis para el desarrollo de esta investigación.,

A todos los docentes que participaron en mi formación académica hasta culminar con éxito mis estudios superiores,

Al personal del centro de Biotecnologías por abrirme sus puertas y brindarme su cooperación para poder realizar este sueño en especial a la Srta. Med. Vet. Jhuliana Katherine Luna Herrera por su apoyo incondicional en el desarrollo de mi tesis.

A los ganaderos del Cantón Loja por su colaboración incondicional.

Jinsop Cuenca

DEDICATORIA

Con mucho cariño y amor la presente tesis la dedico a Dios por cada una de las bendiciones recibidas, a mis padres José Cuenca y Luz Flores que han sido el pilar fundamental de mi vida, por su fortaleza, esfuerzos, paciencia y comprensión, por enseñarme que un tropiezo no es una caída y que siempre hay que levantarse y seguir adelante con más fuerza, a mis hermanos Jasmay, Hamilton, Silvia y Jordy por su cariño y apoyo incondicional, a Jhuliana Katherine Luna Herrera, por todo tu apoyo y confianza, por ser ejemplo de perseverancia y tolerancia y porque eres una de las personas a las cuales les debo este logro.

Jinsop Cuenca

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | Pág. |
|--|------|
| APROBACIÓN | i |
| CERTIFICACIÓN | ii |
| AUTORÍA | iii |
| CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS | iv |
| AGRADECIMIENTO | v |
| DEDICATORIA | vi |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS | vii |
| ÍNDICE DE CUADROS | xi |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xii |
| ÍNDICE DE ANEXOS | xiii |
| RESUMEN | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 3 |
| 2.1. Definición..... | 3 |
| 2.2. Antecedentes..... | 3 |
| 2.3. Etiología..... | 4 |
| 2.3.1. Especies Susceptibles..... | 5 |
| 2.3.2. Ciclo Biológico..... | 5 |
| 2.4. Modo de Transmisión..... | 7 |
| 2.4.1. Transmisión Vertical o Transplacentaria..... | 7 |
| 2.4.2. Transmisión Horizontal o Postnatal..... | 7 |
| 2.5. Factores de Riesgo..... | 8 |
| 2.6. Patogenia..... | 10 |
| 2.6.1. Patogenia de la Infección Aguda..... | 10 |
| 2.6.2. Patogenia de la Infección Crónica y Reactivación de la Enfermedad.. | 12 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.6.3. | Patogenia de la Muerte Fetal..... | 12 |
| 2.7. | Signos Clínicos..... | 13 |
| 2.7.1. | Aborto por <i>Neospora caninum</i> | 13 |
| 2.8. | Lesiones..... | 14 |
| 2.8.1. | Lesiones Histopatológicas..... | 15 |
| 2.9. | Distribución Geográfica..... | 15 |
| 2.10. | Diagnóstico..... | 16 |
| 2.10.1. | Diagnóstico Serológico..... | 16 |
| 2.10.1.1. | Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)..... | 16 |
| 2.10.1.2. | Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)..... | 17 |
| 2.10.1.3. | Microaglutinación..... | 19 |
| 2.10.2. | Diagnóstico Directo..... | 19 |
| 2.10.2.1 | Técnica de Faust..... | 19 |
| 2.10.2.2 | Inmunohistoquímica (IHQ)..... | 19 |
| 2.10.2.3 | Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 20 |
| 2.10.2.4 | Aislamiento..... | 21 |
| 2.10.3. | Diagnóstico Diferencial..... | 21 |
| 2.11. | Tratamiento..... | 22 |
| 2.12. | Control..... | 22 |
| 2.13. | Importancia..... | 23 |
| 2.13.1. | Importancia Económica..... | 23 |
| 2.13.2. | Importancia Sanitaria..... | 24 |
| 2.14. | Estudios Relacionados..... | 24 |
| 3. | METODOLOGÍA..... | 26 |
| 3.1. | Materiales..... | 26 |
| 3.1.1. | Materiales de Campo..... | 26 |
| 3.1.2. | Materiales de Oficina..... | 26 |
| 3.1.3. | Equipos y Materiales de Laboratorio..... | 27 |
| 3.1.4. | Sustancias..... | 27 |

| | | |
|----------|--|----|
| 3.2. | Métodos..... | 28 |
| 3.2.1. | Ubicación del Proyecto..... | 28 |
| 3.2.2. | Cálculo de la Muestra..... | 28 |
| 3.2.3. | Aplicación de Encuesta Epidemiológica..... | 30 |
| 3.2.4. | Recolección de Muestras Sanguíneas..... | 30 |
| 3.2.5. | Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas Competitivo (cELISA) para Detección de Anticuerpos a <i>Neospora caninum</i> en Suero Bovino..... | 30 |
| 3.2.5.1. | Preparación..... | 30 |
| 3.2.5.2. | Procedimiento del Test..... | 31 |
| 3.2.6. | Identificación de la presencia de caninos como factor de riesgo ante la presencia de Neosporosis bovina en las ganaderías del Cantón Loja..... | 33 |
| 3.2.7. | Técnica de Faust para Detección de Ooquistes de <i>Neospora caninum</i> | 34 |
| 3.2.7.1. | Procedimiento..... | 34 |
| 3.3. | Toma y Registro de Datos..... | 35 |
| 3.3.1. | Fase de campo..... | 35 |
| 3.3.2. | Fase de laboratorio..... | 35 |
| 4. | RESULTADOS | 36 |
| 4.1. | Neosporosis bovina en el Cantón Loja..... | 36 |
| 4.1.1. | Prevalencia de Neosporosis bovina..... | 36 |
| 4.1.2. | Porcentaje de Fincas infectadas por Neosporosis bovina..... | 38 |
| 4.2. | Relación entre la presencia de caninos como factor de riesgo y la presencia de Neosporosis bovina en las ganaderías del Cantón Loja..... | 39 |
| 4.3. | Análisis de muestras fecales de caninos presentes en fincas seropositivas..... | 42 |
| 5. | DISCUSIÓN | 43 |

| | | |
|-----------|-----------------------------|-----------|
| 6. | CONCLUSIONES..... | 46 |
| 7. | RECOMENDACIONES..... | 47 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA..... | 48 |
| 9. | ANEXOS..... | 55 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Pág. |
|---|------|
| Cuadro 1. Prevalencia de Neosporosis Bovina en el Cantón Loja por número de reactores positivos a ELISAc..... | 36 |
| Cuadro 2. Porcentaje de fincas infectadas con Neosporosis Bovina por parroquias..... | 39 |
| Cuadro 3. Relación entre la presencia de caninos y la positividad a Neosporosis bovina en el Cantón Loja..... | 40 |
| Cuadro 4. Identificación de ooquistes de <i>Neospora caninum</i> en muestras fecales procedentes de fincas positivas a Neosporosis bovina..... | 42 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Quiste de <i>Neospora caninum</i> | 4 |
| Figura 2. Ciclo de vida de <i>Neospora caninum</i> | 6 |
| Figura 3. Fases de la Técnica ELISA de competición..... | 18 |
| Figura 4. Prevalencia de Neosporosis bovina en el Cantón Loja..... | 36 |
| Figura 5. Porcentaje de Fincas Positivas y Negativas a Neosporosis Bovina por ELISAc en el Cantón Loja..... | 38 |
| Figura 6. Porcentaje de fincas positivas a Neosporosis bovina expuestas y no expuestas al factor de riesgo(caninos)..... | 40 |
| Figura 7. Porcentaje de fincas negativas a Neosporosis bovina expuestas y no expuestas al factor de riesgo(caninos)..... | 41 |

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo N° 1.** Ubicación de las Parroquias Urbanas y Rurales del Cantón Loja.
- Anexo N° 2.** Encuesta Epidemiológica.
- Anexo N° 3.** Recolección de Muestras Sanguíneas.
- Anexo N° 4.** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas Competitivo (ELISAc) para Detección de Anticuerpos a *Neospora caninum* en Suero Bovino.
- Anexo N° 5.** Técnica de Faust para Detección de Ooquistes de *Neospora caninum*.
- Anexo N° 6.** Pruebas Estadísticas utilizadas para obtener el cálculo de Correlación.
- Anexo N° 7.** Registro de Campo.
- Anexo N° 8.** Registro de Laboratorio.
- Anexo N° 9.** Difusión de Resultados

RESUMEN

La presente investigación se desarrolló en las ganaderías de las parroquias urbanas y rurales del Cantón Loja; tuvo una duración de cinco meses, a lo largo de los cuales se realizó la colecta e identificación de 650 muestras sanguíneas de hembras bovinas mayores a un año de edad en 141 fincas. Posterior a la obtención de sueros, se ejecutó el diagnóstico serológico de Neosporosis bovina, mediante ELISAc (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas-Competitivo) con cuyos datos se procedió al cálculo de prevalencia de la enfermedad. Se recogieron además 46 muestras de heces de caninos en las ganaderías en donde se obtuvieron resultados positivos al diagnóstico por ELISAc, las cuales se analizaron por el método coproparasitario de Faust para la identificación de ooquistes del parásito *Neospora caninum*. Estadísticamente se determinó la asociación entre la exposición a la presencia de caninos (Factor de riesgo) y la presencia de la enfermedad.

La prevalencia de Neosporosis bovina en el Cantón fue calculada en un 22,31 %, resultando afectadas el 45,39% de las ganaderías. En el 28, 26% de las muestras de heces se identificaron formas parasitarias semejantes a ooquistes de *Neospora caninum*.

El análisis estadístico permitió obtener valores de $p= 0,0005$ (Chi cuadrado) y $p= 0,0007$ (Test exacto de Fisher) menores a $p=0,05$; y, una OR = 3,3764, demostrando que existe mayor riesgo de enfermedad en las fincas cuando éstos se encuentran expuestas al factor de riesgo, que en fincas en que éste factor se encuentra ausente.

ABSTRACT

This research was developed in the herds in urban and rural parishes of the Canton Loja, It lasted five months, during which the collection and identification of 650 blood samples from female old cattle in 141 farms.

Subsequently obtaining sera, serological diagnosis of bovine Neosporosis was conducted, whose data was proceeded to estimate prevalence of disease which was executed by ELISA (Competitive linked immunosorbent assay Enzyme) 46 canine fecal samples were collected.

At the ranches where positive results were obtained by cELISA, which were analyzed by the method coproparasitario (method of stools) from Faust in order to identify the oocysts of the parasite Neosporacanium.

Statistically the association between exposure to the presence of canines (risk factor) and the presence of the disease was determined. The prevalence of bovine Neosporosis in the city was calculated resulting in 22.31%, and the 45.39% of the ranches have been affected the 28.26% of such stool samples were identified parasitic forms similar to oocysts of Neosporacanium.

Statistical analysis allowed to obtain values of $p = 0.0005$ (Chi square) and $p = 0.0007$ (Fisher's exact test) under $p = 0.05$, OR = 3.3764 and demonstrating that there is more increased risk of disease in farms when they are exposed to the risk factor than in farms where this factor is absent.

1. INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina se encuentra afectada por una serie de factores de diferente índole que disminuyen la eficiencia reproductiva y por ende productiva del hato, sin embargo, el aspecto sanitario cobra importancia cuando se conoce que el 50% de las causas que afectan la reproducción en el ganado bovino son debidas a enfermedades infecciosas (Durán, 2004), dando lugar a la presentación de abortos, infertilidad, muertes embrionarias, malformaciones congénitas y nacimientos de terneros poco viables (débiles o muertos).

La Neosporosis bovina es una enfermedad abortígena parasitaria, calificada como emergente, producida por el protozoo *Neospora caninum*. A partir del año 1991 es reconocida entre las causas importantes de aborto en bovinos en distintos países (Echaide, 2000) ; considerables pérdidas económicas son atribuidas a la subfertilidad, abortos de fetos momificados, nacimiento de crías enfermas, débiles o con cuadros nerviosos manifestados con ataxia, parálisis o trastornos oculares, y al contagio de madres a hijas por varias generaciones.

Lamentablemente en la Región Sur del país no se han dirigido investigaciones que permitan conocer la presencia de *N. caninum* en las ganaderías y mucho menos los factores de riesgo asociados a esta patología; sin embargo, en la sierra centro norte del país se han encontrado resultados de seropositividad del 42 % (Lozada, 2004).

Con estos antecedentes, el presente estudio ha determinado la prevalencia de Neosporosis bovina e identificado la presencia de caninos como factor de riesgo en las ganaderías del cantón Loja, a través de los siguientes objetivos:

- Ejecutar el Test ELISA competitivo para identificar la presencia de anticuerpos séricos a *Neospora caninum* en suero bovino.

- Identificar ooquistes de *Neospora caninum* por medio de la técnica de Faust en los caninos que permanecen en las ganaderías afectadas por Neosporosis bovina.
- Efectuar un análisis de correlación entre la seropositividad de los bovinos y la presencia de caninos como factor de riesgo en las ganaderías del Cantón Loja.
- Difundir los resultados de la investigación a los ganaderos de la zona.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. DEFINICIÓN

La Neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria producida por *Neospora caninum* que cursa con aborto y nacimiento de terneros con sintomatología neuromuscular o clínicamente sanos, pero crónicamente infectados (Fernández et al., 2010).

2.2. ANTECEDENTES

La primera identificación de *N. caninum* tuvo lugar en Noruega (Bjerkas et al., 1984). Se describió un síndrome caracterizado por encefalomiелitis y miositis causado por un parásito similar a *Toxoplasma gondii* en perros jóvenes. En 1988, en los Estados Unidos de América, Dubey et al., propusieron un nuevo género al identificar un protozoo en caninos domésticos con síntomas neuromusculares al que denominaron *Neospora*, con una sola especie representativa hasta ese momento: *N. caninum* (Dubey et al., 1988). Luego se logró el primer aislamiento del agente en cultivo celular y se reprodujo la infección experimentalmente en el perro (Dubey et al., 1988). Dicho agente fue relacionado en el año 1989 con la producción de abortos en bovinos (Thilsted & Dubey, 1989) y posteriormente se registraron pérdidas en la producción de carne y leche (Álvarez, 2003).

Anticuerpos contra *N. caninum* han sido demostrados en sueros de búfalos, coyotes, zorros y camellos, naturalmente expuestos. (Dubey et al., 1999). Por otra parte infecciones experimentales han sido llevadas a cabo con éxito en conejos, gatos, ratas, ratones, cerdos, y monos. El ciclo de vida de *Neospora* fue recientemente confirmado cuando sus ooquistes fueron encontrados en heces de perro (McAllister et al., 1998). Si bien es cierto que la ingestión de ooquistes es una de las rutas de infección para bovinos, muchos estudios han

demostrado que la infección por la vía transplacentaria es la forma de transmisión más importante (Shares et al., 1998; Paré et al., 1996; Davison et al., 1999). El aborto es el signo clínico más importante de esta enfermedad observada en las vacas. Neosporosis ha sido considerada como la mayor causa de abortos en bovinos lecheros en EEUU, donde estiman que entre el 5 y el 15% de las preñeces terminan en aborto y alrededor del 33% de estos abortos son producidos por *Neospora caninum* (Fort, 2004).

Diversos estudios han asociado a la neosporosis con aborto en bovinos, aislando el parásito de los tejidos de fetos abortados. El control y erradicación de esta enfermedad es complejo ya que hasta la fecha no se ha desarrollado un inmunógeno capaz de controlar el problema.

El comportamiento epidemiológico de la enfermedad en el campo reproductivo es variable como su prevalencia. Diferentes estudios han asociado a la neosporosis con eventos como la momificación fetal, la muerte embrionaria temprana, el nacimiento de crías sanas pero persistentemente infectadas o terneras que nacen débiles y mueren a los pocos días de vida.

En el Ecuador se han realizado estudios para establecer la prevalencia de la neosporosis bovina, y como sucede en otros países los resultados han sido variables, estimándose que la enfermedad alcanza el 30% de los animales de los hatos estudiados (Maldonado, 2013).

2.3. ETIOLOGÍA

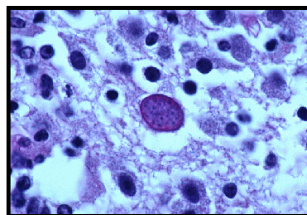


Figura 1. Quiste de *Neospora caninum* (César, 2005).

N. caninum es un protozoo intracelular obligado, perteneciente al phylum *Apicomplexa* y a la familia *Sarcocystidae*. Mediante microscopía electrónica se reconocen organelas características de ese phylum como por ejemplo, micronemas, roptrias y gránulos densos. *N. caninum* es morfológicamente similar a *Toxoplasma gondii*, y está relacionado taxonómicamente a otros protozoos formadores de quistes como *Hammondia heydorni* e *Isospora bigemina*

Los estadios parasitarios reconocidos en su ciclo son: taquizoito, bradizoito y esporozoito. Los taquizoitos y bradizoitos se encuentran en hospedadores intermediarios, mientras que los esporozoitos se eliminan en las heces del perro (Moore et al., 2005).

2.3.1. Especies Susceptibles

Hasta el momento se han demostrado dos huéspedes definitivos, perros y coyotes, pero muy probablemente lo sean también otros carnívoros como zorros y lobos. Se han considerado como huéspedes intermediarios a los caninos, bovinos, ovinos, caprinos y equinos, sin embargo hasta el momento no existen evidencias de que el hombre sea susceptible.

2.3.2. 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. 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). Experimentalmente

incluso se puede llegar a infectar a felinos, ratas, ratones, cerdos y monos. En todos ellos la infección natural ocurre por el consumo de ooquistes esporulados presentes en los alimentos y aguas contaminadas, generando en el hospedero intermediario las otras dos formas del parásito, de ubicación intracelular, taquizoitos y quistes tisulares (bradizoitos). En cuanto a su distribución en tejidos, existe una predilección del protozoo por tejido del sistema nervioso central, incluida la retina. La infección en el perro por tanto, ocurre por el consumo de bradizoitos y taquizoitos, contenidos en los tejidos de las especies animales hospederas intermediarias. Ya a los 5 días comienza a eliminar ooquistes sin esporular y una vez en el medio externo, al cabo de 24 horas, esporulan cuando las condiciones son óptimas. Finalmente, para completar el ciclo, estos ooquistes que contaminan las aguas y los alimentos, deben ser consumidos por sus hospederos intermediarios (Fredes, 2002).

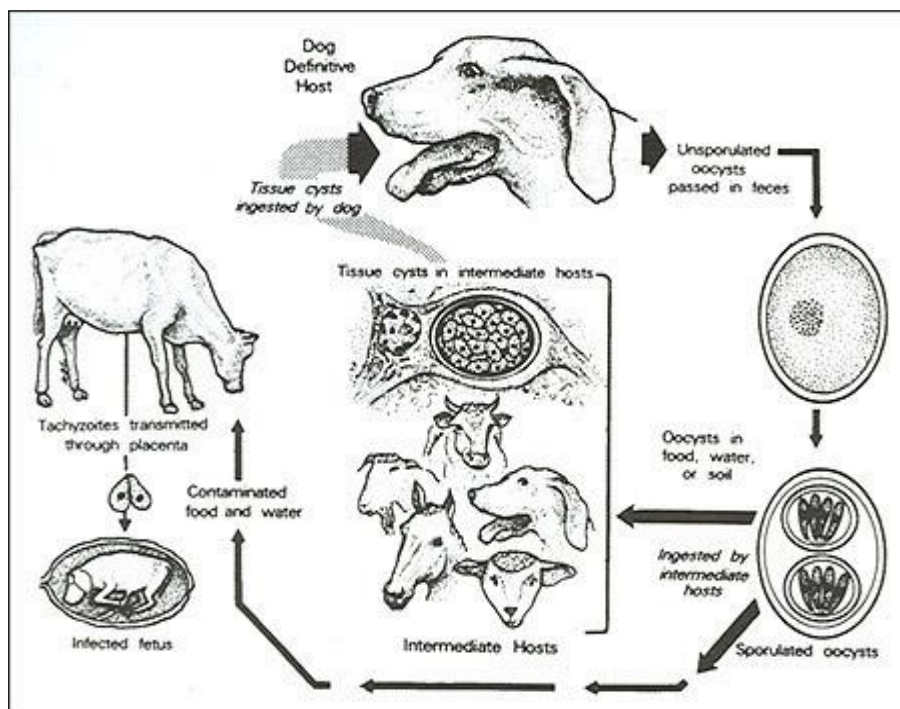


Figura 2. Ciclo de vida de *Neospora caninum* (Fredes, 2002).

2.4. MODO DE TRANSMISIÓN

Hay dos formas de transmisión: Horizontal o Postnatal y Vertical o Transplacentaria.

2.4.1. Transmisión Vertical o Transplacentaria

La transmisión de madre a hija fue sugerida como la principal vía por varios autores. Shares et al., (1998) demostraron que *N. caninum* puede ser mantenida por varias generaciones a un nivel constante de prevalencia, aparentemente sin la necesidad de dispersión de un hospedador definitivo, corroborando la teoría de que la ruta transplacentaria es la más importante en la especie bovina (Fort, 2004).

La vía transplacentaria es la forma más común. Así, una vaca gestante infectada transmite la infección al feto en su útero. Este puede morir y ser abortado o seguir adelante la gestación y nacer infectado y permanecer así de por vida, pudiendo transmitir la infección a sus sucesivas crías. La mayoría de los fetos infectados vía vertical nacen clínicamente sanos y sólo en un pequeño porcentaje, alrededor de 5% de las veces, ocurre muerte fetal.

No existen reportes hasta el momento de casos de transmisión por semen o embriones (Bañales et al., 2011).

2.4.2. Transmisión Horizontal o Postnatal

A pesar de la eficiencia de la transmisión vertical es evidente, de acuerdo a los modelos teóricos, que la infección no podría mantenerse a niveles constantes en un rodeo, si no existiera cierto grado de infección postnatal (Davison et al., 1999). La transmisión horizontal se da de huéspedes definitivos a huéspedes intermediarios, siendo la vía de ingreso la oral.

Recientemente, Dijkstra et al., (2002), evaluaron las rutas de transmisión natural de *Neospora caninum* entre perros de campo y bovinos en un estudio de casos y controles. Los resultados mostraron que el consumo de placenta, material procedente de los fetos abortados y/o descargas uterinas en combinación con defecación en los comederos o lugares de conservación de forrajes fue observada en el 19% de los rodeos controles y en el 75% de los rodeos con problemas. Anderson, (2000) describió que los perros en los tambos mostraban una tendencia a defecar en los silos y en las mezclas de ración, al igual que en la alfalfa fresca que era distribuida diariamente en los comederos (Fort, 2004).

Otra de las posibles potenciales rutas de transmisión horizontal para bovinos es a través del consumo de leche. Gula et al., (1998) muestran que esta vía es apta al alimentar terneros recién nacidos con calostro conteniendo taquizoítos de *N. caninum*. Se constató que los terneros sero-convirtieron y pudo demostrarse DNA compatible con *N. caninum* por la técnica de PCR en material procedente de cerebro. A pesar de ello esta ruta debe ser mejor evaluada en estudios epidemiológicos.

2.5. FACTORES DE RIESGO

Varios estudios epidemiológicos han encontrado asociación entre seroprevalencia de *Neospora* y la presencia de perros en el predio, lo cual sugiere su rol de transmisión de la enfermedad (Larenas, 2005).

Dada la forma de transmisión horizontal es necesaria la contaminación del medio y por lo tanto la intervención del hospedador definitivo, y aunque aún no se ha demostrado la transmisión de una vaca a otra (Barr y col., 1997; Bartels y col.; 1999; Dubey, 1999; Wouda y col., 1999), es importante el resguardo de alimento y agua, para evitar la contaminación de ellos con excrementos de los

perros, así también evitar el consumo de fetos abortados o de terneros muertos por estos animales u otros cánidos.

En cuanto la prevalencia de esta enfermedad protozoaria en bovinos, se puede afirmar que afecta tanto a razas de bovinos lecheros como a las de carne; sin embargo, en algunos países como USA, Nueva Zelanda y Holanda, es la mayor causa de abortos en vacas lecheras.

Existe un estudio de factores de riesgo de *N. caninum* asociados a abortos epidémicos de rebaños lecheros de Bartless y col., en 1999, que menciona con un potencial rol biológico relevante a la presencia de perros, la de aves y el consumo de ensilaje de maíz durante el verano. En cuanto al indudable rol del perro, se describe una significativa asociación entre su presencia y la seropositividad de un rebaño, así también como las aves domésticas como gallinas, patos y gansos, pueden servir de vectores de ooquistes, en particular cuando son criados sin confirmar. Se menciona además que las aves de corral tienen un posible rol de hospedador intermediario. En cuanto al tipo de alimentación, el alimentar a un rebaño lechero con ensilaje de maíz y/o remanentes de alimento, en verano, es considerado un factor de riesgo, debido a que en esta estación existen las condiciones favorables de humedad y temperatura para la esporulación de los ooquistes que contaminen estos alimentos, además de la proliferación de hongos y la producción de micotoxinas. Estas últimas causantes de inmunosupresión al ser ingeridas repetidamente y en bajas dosis, lo cual favorecerían la reactivación de la enfermedad (Bartels et al., 1999). El riesgo de aborto asociado a Neospora también aumenta cuando existen infecciones concomitantes con otros patógenos, como diarrea viral bovina (Fredes, 2002).

Todavía está en debate si los zorros y lobos, que tienen una relación filogenética cercana con los perros, puedan ser también hospederos definitivos de *N. caninum* (Dubayet al., 2007). En otros países se ha determinado que el

coyote y el zorro gris son un factor de riesgo en la transmisión horizontal de la infección (Barling et al., 2000; Gondimet al., 2004). Es probable que el papel epidemiológico de estos animales pueda ser similar y tan importante como el de los perros vagabundos e igual de complicado para evaluarlo con precisión, ya que tiene las mismas oportunidades que ellos para consumir fetos y placentas, así como de depositar heces en diferentes sitios (Arauco, 2013).

Otros factores de riesgo mencionados en la literatura son el confinamiento del ganado lechero y la producción intensiva, ya que se describen bajas prevalencias de infección en ganado lechero criado en pasturas y ganado bovino de carne (Fredes, 2002).

2.6. PATOGENIA

La Neosporosis bovina tiene una patogenia compleja en la que influyen múltiples factores dependientes del hospedador y del parásito. Los diferentes estudios realizados se han llevado a cabo tanto en infecciones naturales como experimentales en la especie bovina. Aunque en estos últimos años se ha avanzado en forma considerable en el conocimiento de esta afección, diversos aspectos permanecen aún hoy sin dilucidar (Fernández, 2003).

2.6.1. Patogenia de la Infección Aguda

Los taquizoitos son la forma de multiplicación rápida del parásito y son los responsables de la fase aguda de la infección. Se multiplican rápida e intracelularmente mediante endodiogenia en muchos tipos de células diferentes, teniendo mayor tropismo por las del sistema nervioso central (SNC), de la placenta, células musculares cardíacas y esqueléticas y células endoteliales (Dubey & Lindsay, 1996). La patogenia de *N. caninum* depende del equilibrio entre la capacidad del taquizoitos para penetrar y multiplicarse dentro las células y la habilidad del hospedador para combatir la proliferación

del parásito. La multiplicación intracelular del parásito produce destrucción celular y la aparición de focos de necrosis. Como consecuencia de este daño en el tejido, se produce una reacción inflamatoria, infiltrándose el tejido lesionado con células inflamatorias, principalmente del tipo mononucleares (Fernández, 2003).

En los bovinos adultos, el aborto es el único signo clínico observado en las vacas gestantes en la fase aguda de la infección. La muerte del feto podría producirse como consecuencia de las lesiones placentarias o fetales aunque no está dilucidado qué la desencadena.

En la fase de parasitemia, llegarían los taquizoitos a la placenta causando la destrucción, necrosis e inflamación del tejido, tanto materno como fetal (Shivaprasad et al., 1989; Barr et al., 1994a; Maley et al., 2003). Una vez en la placenta, los taquizoitos colonizarían el feto en el cual se ha observado la presencia de lesiones, principalmente en el cerebro, corazón e hígado y con menor frecuencia en los pulmones, riñones y membranas fetales (Dubey & Lindsay, 1996) En los terneros congénitamente infectados, las lesiones en músculos y en el SNC serían las responsables de los signos neuromusculares y nerviosos que se observan ocasionalmente (Dubey et al., 1990a; Barr et al., 1991b; Dubey & Lathunda, 1993; Bryan et al., 1994). En el animal adulto se ha observado experimentalmente un aumento de la temperatura y del tamaño de los ganglios linfáticos como respuesta a la inoculación del parásito (Fernández, 2003).

2.6.2. Patogenia de la Infección Crónica y Reactivación de la Enfermedad

Cuando se desarrolla una respuesta inmune, los taquizoitos se transforman en bradizoitos, éstos son la fase de multiplicación lenta de la enfermedad formando los quistes tisulares localizados en el SNC, corazón e hígado. Los quistes con bradizoitos no tienen una acción patógena destacada, por lo que el

animal no desarrolla ninguna sintomatología específica. Sin embargo, en los animales ciertos factores pueden provocar un estado de inmunosupresión desencadenando la reactivación de la enfermedad. En estos casos, los bradizoitos se liberarían de los quistes convirtiéndose en taquizoitos y se produciría de nuevo la fase aguda de la infección. Una posible explicación de la recrudescencia de la enfermedad durante la gestación, sería dada por el efecto inhibitorio de la progesterona (P4) sobre la producción de óxido nítrico (NO), del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) la activación de las células natural killers (NK) y el estímulo de un tipo de respuesta celular Th2 (Fernández, 2003).

2.6.3. Patogenia de la Muerte Fetal

Las causas que desencadenan la muerte fetal parecen ser multifactoriales y aún no se dilucidan con detalles. Se ha señalado que la muerte del feto podría ser debido a una miocarditis (Dubey et al., 1990a). Mientras que Barr et al., (1990) postuló que las lesiones en el SNC serían las principales responsables. Aunque en varias ocasiones no se han observado graves lesiones en órganos vitales del feto por lo que la muerte parece sobrevenir de otros factores (Barr et al., 1990). Por lo expuesto, se ha sugerido la importancia que tiene la respuesta inmune celular desarrollada por las vacas gestantes, sobre todo durante el primer tercio de gestación. Durante la preñez se produce un estado de inmunosupresión concretamente en la placenta, a fin de evitar el rechazo del feto.

2.7. SIGNOS CLÍNICOS

El aborto es el único signo clínico observado en hembras gestantes infectadas (vacas o vaquillonas), y puede ocurrir entre el tercer mes hasta el final del período de gestación, sin embargo la mayoría de las pérdidas se producen entre el quinto y sexto mes; además se sabe que hembras con anticuerpos

contra *Neospora caninum* son más predispuestos a abortar que las seronegativas (Anderson et al., 1991; Dubey, 2003b). Se desconoce si *Neospora caninum* ocasiona pérdidas tempranas de preñez, sin embargo, la infección experimental de vacas a distintos meses de gestación, mostró que la parasitemia durante las primeras dos semanas resultó en un desarrollo anormal del feto y reabsorción de los tejidos fetales en un período de tres semanas siguientes a la infección, y por el contrario, las infecciones producidas a las 30 semanas de gestación dieron como resultado el nacimiento de terneros congénitamente infectados pero sin signos clínicos, siendo esto observado comúnmente (Williams et al., 2000). El feto muerto en el útero puede ser reabsorbido, momificarse, o expulsarse con avanzado grado de autólisis, y aunque no es patognomónico, la momificación es un hallazgo frecuente habiéndose descrito en casos naturales (Wouda et al., 1998) y experimentales (Barr et al., 1994b). Por otro lado, los terneros infectados en el útero, pueden tener signos neurológicos y bajo peso al nacimiento (Barr et al., 1991; Dubey y Lindsay, 1996), mostrando al examen clínico debilidad, falta de crecimiento, ataxia, flexión o hiperextensión de miembros anteriores, parálisis completa de los miembros, disminución del reflejo patelar o falta de sensibilidad propioceptiva, exoftalmia o asimetría ocular (Jara, 2009).

2.7.1. Aborto por *Neospora caninum*

Diferentes estudios epidemiológicos evidencian que es más probable que aborten vacas seropositivas a *Neospora* que las seronegativas (Wouda et al., 1999; Anderson et al., 2000; Stenlund, 2000; Dubey, 2003; Moore et al., 2005), siendo el riesgo de abortar 3 a 7 veces mayor en las vacas infectadas que en las no infectadas (Innes et al., 2001; Williams et al., 2003). Hay estudios que indican que una vaca que abortó previamente por *Neospora* tiene un menor riesgo de abortar en su siguiente gestación por esta causa, pero este dato es posible que esté influido por el grado de eliminación selectiva de las vacas que han abortado en un predio (Larenas, 2005).

El aborto puede ser epidémico o endémico. Se considera un patrón de abortos endémicos cuando la tasa de abortos es mayor al 5% anual y que persiste por años (Anderson et al., 2000) y los abortos son epidémicos cuando más del 10% de las vacas abortan dentro de 6 a 8 semanas. Aproximadamente el 5% de las vacas de un rebaño presentan abortos repetidos debidos a *Neospora* (Cruz, 2011).

2.8. LESIONES

Neospora caninum causa muerte celular acompañada por lesiones necróticas visibles en varios días, debido a una activa replicación de los taquizoitos, provocando daños en la conductividad nerviosa-muscular, causado por la destrucción de células nerviosas, así como daño cerebral y de la médula espinal (Georgieva et al., 2006). Un estudio determinó que 82 fetos bovinos presentaron encefalitis y miosistis como lesiones predominantes, seguido de adrenalitis, nefritis, hepatitis, placentitis y neumonía (Barr et al., 1991); por otro lado, en caninos se observa neumonía, pancreatitis, hepatitis, dermatitis (úlceras cutáneas focales), miositis, miocarditis, megaesófago (Jara, 2009).

2.8.1. Lesiones Histopatológicas

Se observa inflamación del sistema nervioso central (SNC), cerebro y médula espinal. En el cerebro la inflamación se distribuye multifocalmente, con zonas de necrosis y atrofia, observando además una meningitis, meningoencefalomielitis no supurativa multifocal, además de gliosis focal asociado a cuadros de malacia alrededor de los quistes tisulares (Cantile y Arispici, 2002). Las lesiones observadas en bovinos y caninos incluyen: miositis necrotizante multifocal del músculo cardiaco, además la lesión miocardial puede presentar autólisis; lesiones hepáticas que consisten en un edema portal con degeneración hidrópica, infiltrado de células mononucleares a nivel periportal, además de focos de necrosis hepatocelular; a nivel pulmonar se

observa necrosis focal con exudado fibrinoso e infiltración de células inflamatorias además de hiperplasia epitelial alveolar; además de otras lesiones observadas como nefritis intersticial focal, pancreatitis necrotizante multifocal y una severa dermatitis, reportada sólo en perros, con presencia de úlceras cutáneas focales o multifocales donde se observan taquizoitos además de necrosis (Barber, 1998; Basso et al., 2005; Mc Allister, 2005). En terneros, puede observarse zonas pálidas a oscuras con focos de necrosis en el cerebro, que consisten en encefalomiелitis no supurativa multifocal o difusa a nivel de meninges y a veces con calcificación (Dubey, 2003b). Además, en fetos de búfalos se observa procesos inflamatorios no supurativos en corazón, cerebro, riñón, músculo, hígado, y quistes compatibles a *Neospora caninum* en cerebro (Guarino et al., 2000). Por otro lado, en gatos, se observó experimentalmente encefalomiелitis, polimiositis y hepatitis (Jara, 2009).

2.9. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La enfermedad está ampliamente distribuida informándose su presencia en varios continentes como: África, América, Europa y Oceanía. Aunque la neosporosis fue descrita hace dos décadas atrás, los avances en el conocimiento han sido satisfactorios quedando por investigar numerosos aspectos relacionados a la prevención y control. También es motivo de investigación la frecuencia natural de la transmisión postnatal en el bovino existencia de otras especies de hábitos carnívoros que pueden comportarse como hospedadores definitivos de la enfermedad (Cruz, 2011).

Por ser una enfermedad de carácter cosmopolita según reportes de diferentes autores y de acuerdo a estudios ya realizados en lo que se respecta al Ecuador; se sabe que *Neospora caninum* está presente en las principales zonas lecheras de la sierra así como en las tres regiones; como fue reportado en estudios realizados en el cantón Mejía por M. Ortiz, (2002) el 30% de

seropositivos en 1249 muestras; y, en la zona centro norte de la sierra Lozada, (2004) con valores de 42% de animales seropositivos *Neospora caninum*.

2.10. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico se basa en la historia clínica, signos clínicos, epidemiología, lesiones macroscópicas y microscópicas (histopatología), además de pruebas complementarias: serológicas y no serológicas (Jara, 2009).

La detección de anticuerpos para *N. caninum* en los animales sospechosos indica a exposición al parásito.

2.10.1. Diagnóstico Serológico

2.10.1.1. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) fue la primera prueba inmunoserológica usada para la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* y se la ha utilizado como prueba de referencia para el desarrollo de otras técnicas. Se considera que es adecuada para detectar infección en los animales y para caracterizar epidemiológicamente el rodeo de acuerdo a los valores de los títulos, la sensibilidad y especificidad de la prueba varía de 82.4 a 97 % y 85.7 a 90 % respectivamente (Odeón et al., 2001).

2.10.1.2. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Las pruebas de ELISA pueden utilizarse para detectar o cuantificar tanto antígenos como anticuerpos, pueden aplicarse fácilmente a diversos fluidos como leche u orina, requieren pequeños volúmenes de muestra y son relativamente rápidas. Otra propiedad importante es que la señal emitida puede ser cuantificada por aparatos específicos (espectrofotómetro dando un

resultado objetivo que puede ser fácilmente automatizado) (Lützel Schwab, 2005).

El ELISA ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la Neosporosis. La facilidad para procesar un gran número de muestras, la obtención de una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con la IFI, sumado a la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, hacen confiable a esta prueba (Cruz, 2011).

El título de corte o el valor de observancia asignado a una prueba es motivo de controversia ya que depende de factores tales como composición del antígeno, anticuerpos identificados y de los conjugados utilizados (Dubey, J.P., Jenkins, M.C., Adams D.S., McAllister, M.M). Un determinado título o valor de corte debería ajustarse a cada circunstancia o situación epidemiológica.

ELISA, es la unión covalente de enzimas a las moléculas de los anticuerpos produciendo una herramienta inmunológica que posee alta especificidad y alta sensibilidad, la técnica llamada ELISA, utiliza los anticuerpos a los que se han enlazado covalentemente las enzimas de modo que quedan sin alteración las propiedades catalíticas de la enzima y la especificidad del anticuerpo.

Las enzimas enlazadas, típicamente incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina y galactosidasa, todas las cuales catalizan reacciones cuyos productos son de color y se pueden determinar en cantidades muy pequeñas (Gamon, 2010).



Figura 3. Fases de la Técnica Elisa de competición (Sánchez, 2004).

El ELISA competitivo tiene por objeto determinar la concentración de Antígenos o Anticuerpos. El método se basa en la competencia entre el Ag de la muestra y un Ag marcado con enzima por la unión con el Ac de captura.

Cuanto menor sea la intensidad del color generado (menor absorbancia) mayor será la concentración de Ag en la muestra problema. Los valores se calculan a partir de una curva patrón construida con concentraciones conocidas de Ag (Lützelshwab, 2005).

2.10.1.3. Microaglutinación

La microaglutinación es una prueba serológica relevante en el diagnóstico de la neosporosis. No requiere conjugados de difícil adquisición y permite analizar sueros de varias especies simultáneamente. Tiene alta repetibilidad entre operarios, es barata, de fácil lectura, utiliza poco equipamiento y materiales. Aunque la técnica descrita por Romand destruye la IgM por utilización del 2 – mercaptoetanol, la temprana aparición de la IgG en la neosporosis bovina permite la utilización de esta prueba en el diagnóstico serológico.

Comparándose la técnica de microaglutinación e IFI, la sensibilidad y la especificidad que se obtuvo fue 100% vs. 98% y 97% vs. 99% respectivamente (Odeón et al., 2001).

2.10.2. Diagnóstico Directo

2.10.2.1. Técnica de Faust

Es un método de sedimentación y flotación por centrifugación con sulfato de zinc al 33,3% y densidad 1,18. Se basa en que los quistes y/o huevos de los parásitos flotan en la superficie por ser de menor densidad que el sulfato de zinc a 33,3%, cuya densidad es 1,18. Es útil para la búsqueda de quistes y/o huevos de parásitos y excepcionalmente se observan larvas.

2.10.2.2. Inmunohistoquímica (IHQ)

La inmunohistoquímica (IHQ) realizada sobre tejidos fetales formolados con lesiones histopatológicas compatibles, permite la identificación de *Neospora caninum* con alta especificidad, adquiriendo valor diagnóstico relevante. Aunque su sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados, resulta una técnica diagnóstica vigente.

La utilización de anticuerpos policlonales en la técnica de IHQ puede ocasionar reacción cruzada con *Toxoplasma gondii*. Sin embargo, al no estar comprobado que *T. gondii* es causa importante de abortos en bovinos, esta limitante no sería significativa para dichos especímenes. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra taquizoítos de NC, pero su utilización para IHQ aún no ha sido evaluada (Odeón et al., 2001).

2.10.2.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La prueba de Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) juega un rol importante en el diagnóstico y la investigación de *N. caninum*. Bosso y col en el 2001, demostraron la utilidad de esta prueba para el diagnóstico etiológico en casos de abortos bovinos, en los cuales el aislamiento del protozoo es muy difícil y la serología negativa no es confirmatoria. Se ha utilizado esta técnica para identificar el ADN de *N. caninum* en muestras de tejido fetales, líquido amniótico, ooquistes en heces de perros y coyotes, tejidos de hospedadores intermediarios, sangre, leche y semen. La técnica PCR ha permitido un gran avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas por ser extremadamente sensible y específica.

En el diagnóstico de la neosporosis bovina, su impacto ha sido notable permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos. En un estudio realizado sobre 83 fetos bovinos abortados, se encontró 24 (29%) cerebros positivos a NC por PCR. El examen histopatológico de estos casos positivos a NC por PCR reveló que 18 de los fetos presentaron lesiones compatibles con infección por protozoo. Sólo 6/24 (25%) casos positivos a NCPCR tuvieron anticuerpos demostrados por IFI y ELISA. Este hallazgo sugiere que las pruebas serológicas a partir de fluidos fetales son de relativo valor y probablemente el resultado serológico de la madre aporte más información referente a la posibilidad de infección en el feto.

Otro estudio donde se correlacionaron diferentes pruebas diagnósticas, se encontró que en 6/8 fetos bovinos con lesiones histopatológicas compatibles a NC y negativos a la IHQ, se amplificó su ADN (Moore y Odeón, 2001).

2.10.2.4. Aislamiento

El aislamiento de *Neospora* en cultivo in vitro permite la caracterización del parásito y es específicamente útil para los estudios epidemiológicos regionales.

Sin embargo, su cultivo no es sencillo ya que depende del grado de autólisis a la que es sensible *Neospora caninum*, y de la abundancia y distribución del parásito en el tejido seleccionado. Cuando se requiere de la precisión del diagnóstico, se han utilizado para este fin cultivos in vivo a partir de inoculaciones de tejido sospechoso a ratones (Ramírez, 2008).

2.10.3. Diagnóstico Diferencial

Los abortos constituyen una de las mayores pérdidas económicas de la industria del ganado vacuno y la neosporosis bovina es sólo una más de las causas que deben contemplarse en el diagnóstico de los abortos bovinos. La etiología del aborto sólo se consigue diagnosticar en el 20-50% de los casos.

Entre las causas productoras de mortalidad embrionaria y aborto, las de etiología transmisible suponen más del 90% del total de los diagnósticos. Entre los agentes de etiología vírica se destacan dos enfermedades: la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR) y la diarrea vírica bovina (BVD). Entre los de etiología bacteriana: *Brucella sp.*, *Actinomyces pyogenes*, *Campylobacter fetus subsp. venerealis* y *Campylobacter fetus subsp. fetus*, *Salmonella sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus sp.* y *E. coli*. También la listeriosis y el aborto micótico suponen un porcentaje importante de los abortos en algunas zonas.

2.11. TRATAMIENTO

Existe información acerca de la sensibilidad in vitro de *Neospora caninum* a ciertos antimicrobianos, reportando que de un total de 43 sustancias probadas, 17 ocasionaron una reducción total del número de taquizoitos cultivados in vitro, observando que entre las drogas más efectivas se encuentran la clindamicina, diclazuril, robenidina y pirimetamina; sin embargo la eficacia de dichas drogas en bovinos no ha sido aún estudiada (Lindsay et al., 1994). Por otro lado, la administración de monensina a razón de 40-120mg/cabeza/día no resultó efectiva en bovinos naturalmente infectados (Moore et al., 2001); además, recientemente se ha informado que utilizando toltrazuril y ponazuril, los cuales son derivados de una droga llamada triazinona utilizada en el tratamiento de las coccidiosis, se logró disminuir las lesiones cerebrales de terneros inoculados experimentalmente, quedando demostrado que actualmente no existe tratamiento en los bovinos que los libere de la enfermedad (Moore et al., 2005).

2.12. CONTROL

En general, la neosporosis se presenta como una causa más de aborto y el control debe ir encaminado, fundamentalmente, a reducir la prevalencia de la infección en las explotaciones con brotes declarados y a prevenir su propagación a otras evitando tanto la transmisión horizontal como la vertical.

Las medidas de control de la infección, en un futuro, deberán incluir además el tratamiento químico y la inmunoprofilaxis.

La restricción de la infección post natal, va enfocada en disminuir el riesgo de infección con la ingestión de ooquistes eliminados en las heces del hospedero definitivo, restringiendo el acceso de los perros a las fuentes de agua, pasturas, galpones y silos donde se almacene alimento para los bovinos; además de

recolectar los fetos abortados y placentas para eliminarlos a fin de evitar la fuente de infección para los caninos (Jara, 2009).

Como la transmisión congénita se da comúnmente en el ganado bovino, se sugieren medidas de manejo como: no dejar crías de animales seropositivos para reposición, dado su alto riesgo de ser congénitamente infectados; reponer animales seronegativos a neosporosis en el hato, realizar análisis serológico a todo animal nuevo que ingrese al establecimiento para así identificar animales seropositivos a neosporosis; realizar un seguimiento del desempeño reproductivo del hato, con el fin de detectar pérdida de gestación; efectuar un análisis serológico del hato para identificar animales seropositivos; aislar animales seropositivos y que posean al menos un aborto; en establecimientos donde se realice la transferencia de embriones, deberá utilizarse receptoras seronegativas a la enfermedad; recuperar fetos y placentas abortados para enviarlos a centros de diagnóstico con la finalidad de determinar el agente infeccioso (Moore et al., 2005).

2.13. IMPORTANCIA

2.13.1. Importancia Económica

El efecto más importante de la Neosporosis en los bovinos es la producción de abortos, con las consecuentes pérdidas económicas que ello ocasiona a los productores.

Sin embargo, existen otras pérdidas que no son tan visibles, pero que tienen un impacto real en la economía, como por ejemplo la reabsorción embrionaria, infertilidad, muerte perinatal y descarte prematuro de animales seropositivos por bajo rendimiento en los rodeos. A estas pérdidas hay que sumarle los costos ocasionados por la asistencia profesional, el diagnóstico, la disminución de la producción láctea y el costo del reemplazo de las vacas abortadas.

2.13.2. Importancia Sanitaria

Hasta el momento, no se ha detectado la presencia de *N. caninum* en el hombre, pero su estrecha relación con *T. gondii* - patógeno importante en mujeres gestantes y en individuos inmunodeprimidos- y el hecho de que la infección haya sido establecida experimentalmente en el macaco apuntan la posibilidad de la infección humana. Petersen et al., (1999) no detectaron anticuerpos frente a *N. caninum* en el suero de 76 mujeres con una historia de abortos repetidos. Por el contrario, Nam, et al., (1998) detectaron -mediante ELISA, western-blotting e inmunofluorescencia- la presencia de anticuerpos anti-*N. caninum* en el suero de 12 de 172 (6,7%) individuos seropositivos a *T. gondii* y en 1 de entre 110 individuos seronegativos a este parásito. Posteriormente, Tranas et al., (1999) también detectaron anticuerpos anti-*N. caninum* en el suero de 69 de 1.029 (6,7%) mujeres con antecedentes de aborto mediante IFI y Western blot. Aunque la tasa de seropositividad fue muy baja, estos resultados indican que anticuerpos frente a *N. caninum* pueden estar presentes en el suero humano y no se debe descartar la posibilidad de la infección por este parásito afecte al hombre.

2.14. ESTUDIOS RELACIONADOS

- Lozada (2004), realizó un trabajo sobre *Determinación de la presencia de anticuerpos a Neospora caninum en hatos lecheros de la sierra centro norte del Ecuador, por Prueba Inmunoenzimática*, para diagnosticar neosporosis bovina, en el cual se tomaron muestras de sangre a 395 bovinos y obtuvo una prevalencia del 42% de reactores positivos.
- Cruz (2011), efectuó un estudio sobre *Identificación del parasito "Neospora caninum" en bovinos por medio del método de ELISA, en las haciendas ganaderas del cantón Tulcán en la Provincia del Carchi*, a 182

bovinos, obteniendo como resultados que la prevalencia fue de 51,64% de reactores positivos.

- Cajamarca y Reyes (2012), desarrollaron una investigación sobre Determinación de la incidencia de Sarcocistosis Bovina en Animales Positivos a Neosporosis, en trece haciendas ganaderas en Machachi, cantón Mejía, en 145 bovinos, obteniendo como resultado 18,6% de reactores positivos a neosporosis.
- Alarico (2012), realizaron una investigación sobre Determinación de Seroprevalencia de Anticuerpos a Neospora caninum en Bovinos de leche del distrito de Locumba-Tacna 2012, en una muestra de 195 bovinos, obteniendo como resultados 44,10% de reactores positivos.
- Obando et al., (2010), en su artículo sobre “*Neospora caninum* en un rebaño lechero y su asociación con el aborto” en el Maracay, Venezuela se analizaron 169 muestras sanguíneas obteniendo una prevalencia del 44% de reactores positivos.

3. METODOLOGÍA

3.1. MATERIALES

3.1.1. Material de Campo

- 650 muestras hembras bovinas.
- Muestras fecales de los perros de las haciendas positivas.
- Cajas para muestras fecales.
- 141 Encuestas epidemiológicas.
- 141 Registros de campo.
- Tubos vacutainer de 10 ml sin anticoagulante.
- Agujas toma múltiple calibre 22.
- Guantes de examinación.
- Mascarillas desechables.
- Overol.
- Botas.
- Material de sujeción.
- Caja de herramientas.
- Cooler.
- Gradillas.
- Cámara fotográfica.
- Desinfectantes.

3.1.2. Material de Oficina

- Computadora.
- Calculadora.
- Esferográficos.
- Hojas de papel.

- Internet.
- Memoria flash.
- Libreta.
- Impresora.
- Borrador.

3.1.3. Equipos y Materiales de Laboratorio

- Espectrofotómetro.
- Lavador de microplacas.
- Centrífuga.
- Porta y cubre objetos.
- Rejilla par tubos de ensayo.
- Tubos de ensayo.
- Gasas.
- Microscopio.
- Pipeta automática multicanal de volumen ajustable.
- Puntas de plástico desechables.
- Microtubos.
- Vasos de precipitación de distintos volúmenes.
- Varillas magnéticas.
- Papel absorbente.
- Probetas graduadas.
- Timer.

3.1.4. Sustancias

- Agua destilada
- Sulfato de Zinc al 33%
- Lugol

- Kit diagnóstico de cELISA
 - ✓ Placas revestidas con Antígeno
 - ✓ Control positivo
 - ✓ Control negativo
 - ✓ Conjugado Anticuerpo- Peroxidasa 100X
 - ✓ Dilución Buffer conjugada
 - ✓ Solución concentrada de lavado 10X
 - ✓ Solución de sustrato
 - ✓ Solución para parar la reacción

3.2. Métodos

3.2.1. Ubicación del Proyecto

El presente estudio se llevó a cabo en el Cantón Loja, ubicado al sur del Ecuador en la parte oriental de la Provincia del mismo nombre, limita al norte con el Cantón Saraguro, al este con la Provincia de Zamora Chinchipe y al oeste con la parte alta de la Provincia de El Oro, y los Cantones de Catamayo, Gonzanamá y Quilanga. (UTPL, 2011).

La toma de muestras de sangre en hembras bovinas y la aplicación de la encuestas epidemiológicas se realizó en ganaderías de las parroquias urbanas y rurales: El Valle, Sucre, San Sebastián, Chantaco, Chuquiribamba, El Cisne, Gualiel, Jimbilla, Malacatos, Quinara, San Lucas, San Pedro de Vilcabamba, Santiago, Taquil, Vilcabamba y Yangana (Anexo N° 1).

3.2.2. Cálculo de la Muestra

Se lo realizó mediante la fórmula para calcular proporción de una enfermedad cuando la población con la que se pretende trabajar es conocida (46 860).

$$n = \frac{N * Za^2 * p * q}{d^2(N - 1) + Za^2 * p * q}$$

Fuente: Fernández, 1996

En donde:

- **N** = Total de la población (46860 hembras bovinas según el Censo Agropecuario, 2000).
- **Za2** = 1.962 (si la seguridad es del 95%)
- **p** = proporción esperada (en este caso 50% = 0.5, al no conocerse datos previos de la enfermedad).
- **q** = 1 – p (en este caso 1-0.5 = 0.5)
- **d** = precisión (en este caso deseamos un 4%).

$$n = \frac{46860 * 1,96^2 * 0,5 * 0,5}{0,04^2(46859) + 1,96^2 * 0,05 * 0,05}$$

n= 591 hembras bovinas

La zona ganadera del presente estudio, muestra gran variabilidad de la población, por lo cual el número de la muestra calculado anteriormente, se ha incrementado en un 10 %, que resulta en un total de:

n= 650 hembras bovinas

Para calcular el número de fincas que fueron muestreadas en el Cantón Loja, se dividió el tamaño de la muestra para el promedio de animales de la población de interés por Unidad Productiva Agropecuaria UPA (4,6), dando 141 UPAs. Cada parroquia urbana y rural formará un conglomerado y se realizará muestreo al azar.

3.2.3. Aplicación de Encuesta Epidemiológica

En cada UPA se aplicó una encuesta con preguntas de carácter cerrado que permitió conocer datos generales de la UPA, sistema de reproducción, control sanitario y factores de riesgo asociados a Neosporosis bovina (Anexo N° 2).

3.2.4. Recolección de Muestras Sanguíneas

Se tomaron 650 muestras de sangre de la vena coccígea (6-8 ml) previa desinfección del lugar de extracción (Anexo N° 3). Cada muestra fue registrada en el laboratorio y se confirmó la presencia de todas las muestras de acuerdo al registro de campo, las mismas fueron sometidas a centrifugación a 2000 rpm durante 4 minutos para la obtención de suero que fue alicuotado en dos crioviales debidamente rotulados, uno de los cuales se almacenó en congelación en el banco de sueros del Centro de Biotecnología, y el otro fue conservado en refrigeración a -4 °C hasta la ejecución de la prueba serológica correspondiente.

3.2.5. Ensayo Por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas Competitivo (ELISAc) para Detección de Anticuerpos a *Neospora caninum* en Suero Bovino.

3.2.5.1. Preparación

- a. Se llevaron las muestras de suero, reactivos y placas a temperatura ambiente antes de iniciar el test.
- b. Los controles, positivo y negativo se dispusieron en duplicado, sin tomar en cuenta el número de muestras de suero para probarse.

- c. Se colocaron y aseguraron las bandas para ser usadas en el marco de acuerdo a la orientación del diagrama indicado.
- d. Se preparó el conjugado Anticuerpo-Peroxidasa con 99 partes de solución buffer conjugada. Ejemplo: para 96 pocillos, se mezcló 60 ul de Conjugado Anticuerpo-Peroxidasa con 5.940 ml de solución buffer conjugada.
- e. Se preparó la solución de lavado concentrada 10X con 9 partes de agua deionizada o destilada.
- f. Las muestras de suero fueron sometidas a prueba sin ser diluidas.

3.2.5.2. Procedimiento del Test

- a. Se depositaron controles y muestras de suero en cantidad de 50 ul por pocillo asegurándose que las muestras cubran el fondo de la placa. Luego se incubó a temperatura ambiente durante una hora (21 a 25 °C, 70-77°F), sin cubrir.
- b. Se lava las placas tres veces manualmente, arrojando el contenido de las placas dentro del lavabo y removiendo el sobrante de suero y controles invirtiendo bruscamente la placa por cuatro veces sobre una toalla de papel limpia, sobre una superficie limpia en cada ocasión.
- c. Se adicionó 50 ul de conjugado Anticuerpo-Peroxidasa a cada pocillo. Asegurándose que el conjugado esté adherido al fondo de los pocillos, posteriormente se incubó 20 minutos a temperatura ambiente (21-25 °C; 70-77 °F), sin cubrir.

- d. Después de 20 minutos de incubación, se repitió el procedimiento de lavado descrito en el paso 2.
- e. Se adicionó 50 ul de solución sustrato a cada pocillo asegurándose que el sustrato está fijado al fondo de las placas. Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente (21-25°C; 70-77°F), sin cubrir.
- f. Se agregó 50 ul de solución “Stop” a cada pocillo.
- g. Inmediatamente después de adicionar la solución de parada, la placa fue leída en un lector de placas. Se estableció la densidad óptica (O.D.), leyendo la longitud de onda a 630 nm.
- h. Finalmente se procedió a la validación del Test.

- El **Control Negativo** produjo una densidad óptica mayor o igual a 0.30 y menor a 2,50.
- El **control positivo** produjo una inhibición mayor o igual al 30%.
- Se calculó el porcentaje de inhibición (%I), mediante la siguiente fórmula:

$$\% I = 100 - ((\text{Sample O.D.} \times 100) / (\text{Mean Negative control O.D.}))$$

- i. Interpretación de resultados
- Las muestras que produjeron inhibición mayor o iguala al 30%, se consideraron positivas.
 - Las muestras que produjeron inhibición menos del 30%, se consideraron negativas (Anexo N° 4).

3.2.6. Identificación de la presencia de caninos como factor de riesgo ante la presencia de Neosporosis bovina en las ganaderías del Cantón Loja.

La asociación entre las variables: Independiente (Neosporosis canina) y dependiente (Presencia del hospedador definitivo) se determinó a través de las herramientas de cálculo del programa estadístico "R". Test de Fisher y Chi Cuadrado, para las cuales se ha establecido dos hipótesis: **a)** Hipótesis nula, en donde la presencia o ausencia de la enfermedad no está determinada por la exposición al factor de riesgo; y, **b)** Hipótesis alternativa, la cual expresa que ambas variables tienen asociación.

Éstas dos pruebas permitieron establecer además el valor de p , que rechaza la hipótesis nula cuando es menor al 5 % ($p < 0.05$) por lo tanto se asume que las dos variables no son independientes, sino que están asociadas.

La Odds Ratio (OR) de prevalencia es un concepto ampliamente utilizado en la investigación biomédica que se ha traducido de múltiples formas al español: razón de oportunidades, razón de posibilidades, oportunidad relativa, razón de probabilidades o razón de productos cruzados (**Sócrates et al, 2010**), y se empleó en la presente investigación para cuantificar o medir el riesgo de identificarse Neosporosis bovina en fincas en las que estaba presente el factor de riesgo; éste valor se obtuvo como el cociente de la Odds de fincas expuestas y la Odds de fincas no expuestas al factor de riesgo con el mismo programa estadístico que ya se mencionó anteriormente.

3.2.7. Técnica de Faust para Detección de Ooquistes de *Neospora caninum*

3.2.7.1. Procedimiento

- Se preparó una suspensión homogénea con 1 a 2 g de materia fecal en 10 ml de agua destilada.
- Se filtró la suspensión a través de un colador o una gasa doblada en cuatro, en un recipiente limpio.
- Se colocó en un tubo de ensayo la mezcla filtrada y se centrifugó el filtrado a 1500 rpm por 3 min.
- El líquido sobrenadante se decantó (dejando sólo el sedimento) y se volvió a completar con agua hasta igualar la medida anterior, y se centrifugó nuevamente.
- Se resuspendió el sedimento.
- El procedimiento fue repetido 3-5 veces hasta que el líquido sobrenadante esté limpio.
- Se decantó nuevamente el líquido sobrenadante reemplazándolo por igual cantidad de solución de sulfato de Zinc al 33%, y se mezcló bien la solución con el sedimento.
- Se centrifugó durante 3 minutos a 1500 rpm.
- Se colocó el tubo de ensayo en una rejilla y se agregó más solución de sulfato de zinc al 33% hasta el borde dejando un menisco convexo.

- Se colocó una placa cubreobjetos y se esperó de 10 a 20 minutos. Se puso una gota de lugol en la placa portaobjetos, sobre la cual se depositó la placa cubreobjetos.
- Finalmente, se observó en el microscopio con lente de 10X y 40X (VIRBAC, 2011) (Anexo N° 5).

3.3. TOMA Y REGISTRO DE DATOS

3.3.1. Fase de Campo

Se recogieron los datos correspondientes a 141 encuestas epidemiológicas y registros de campo, los cuales permitieron organizar la información y número de muestras sanguíneas de bovinos en cada una de las ganaderías (Anexos N° 7 y N° 8). La difusión de los resultados tuvo lugar en cada finca muestreada, de manera personal en dónde además se brindó asesoría técnica acerca de las medidas de control sobre la enfermedad en estudio (Anexo N° 9).

3.3.2. Fase de Laboratorio

Los resultados obtenidos del diagnóstico serológico por el método cELISA se organizaron en registros que permanecen en el Centro de Biotecnología. En base a los cuales se elaboró un listado de las fincas infectadas con Neosporosis bovina, de las cuales se tomaron muestras fecales de caninos.

4. RESULTADOS

4.1. Neosporosis bovina en el Cantón Loja.

4.1.1. Prevalencia de Neosporosis bovina

Para determinar la prevalencia de Neosporosis bovina en el Cantón Loja se estableció la relación entre el número de casos positivos y el número total de muestras analizadas. Es decir, se obtuvieron 650 muestras de suero bovino, de las cuales se diagnosticaron 145 casos positivos mediante la técnica de ELISAc, que corresponde a una prevalencia del 22,31% (Figura 4). Los valores más elevados se observan en las parroquias San Sebastián, Jimbilla, El Valle, San Lucas con porcentajes que se encuentran alrededor del 30% (Cuadro 1)

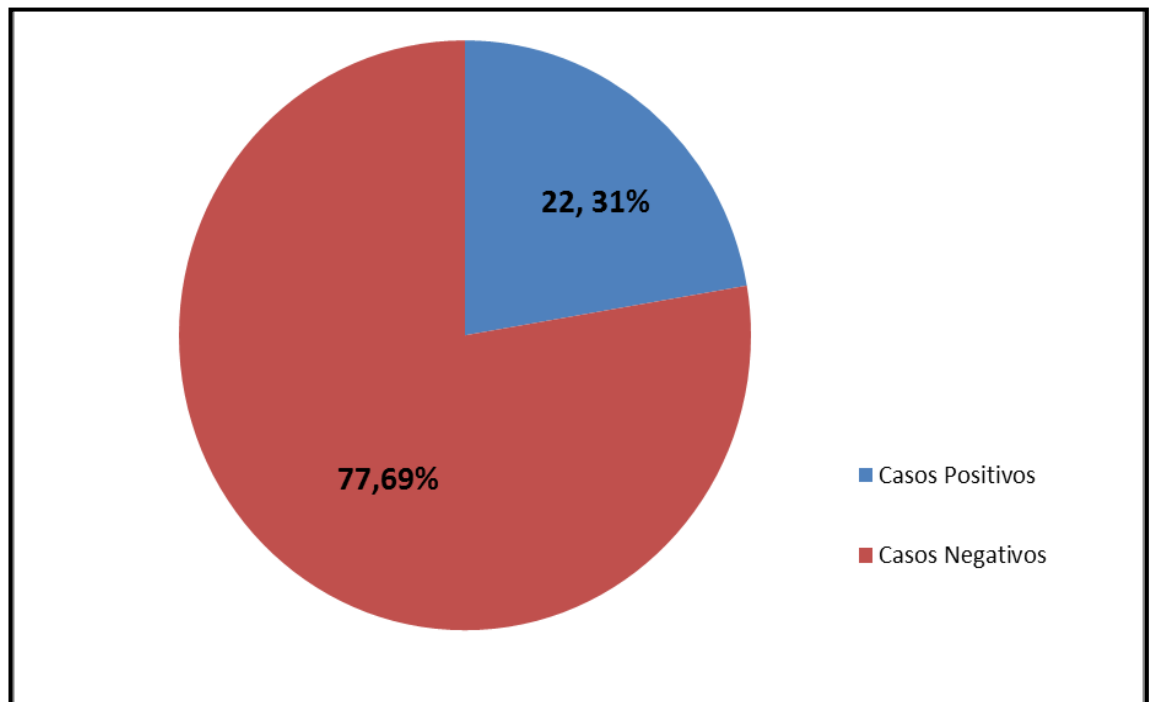


Figura 4. Prevalencia de Neosporosis bovina en el Cantón Loja.

Cuadro 1. Prevalencia de Neosporosis Bovina en el Cantón Loja por número de reactores positivos a ELISAc

| PARROQUIAS | Total de Muestras | Casos Seropositivos | Casos Seronegativos | PREVALENCIA % |
|-------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|
| SAN SEBASTIAN | 117 | 37 | 80 | 31.62 |
| SUCRE | 36 | 7 | 29 | 19.44 |
| TAQUIL | 59 | 12 | 47 | 20.34 |
| EL CISNE | 27 | 4 | 23 | 14.81 |
| SANTIAGO | 41 | 9 | 32 | 21.95 |
| EL VALLE | 142 | 40 | 102 | 28.17 |
| CHANTACO | 15 | 1 | 14 | 6.67 |
| JIMBILLA | 8 | 3 | 5 | 37.50 |
| MALACATOS | 26 | 3 | 23 | 11.54 |
| CHUQUIRIBAMBA | 14 | 2 | 12 | 14.29 |
| VILCABAMBA | 15 | 2 | 13 | 13.33 |
| YANGANA | 64 | 8 | 56 | 12.50 |
| SAN LUCAS | 55 | 16 | 39 | 29.09 |
| GUALEL | 16 | 0 | 16 | 0.00 |
| SAN PEDRO DE VILCABAMBA | 2 | 0 | 2 | 0.00 |
| QUINARA | 13 | 1 | 12 | 7.69 |
| TOTAL | 650 | 145 | 505 | 22.31 |

Fuente: Directa

Elaboración: El Autor, 2013.

4.1.2. Porcentaje de Fincas infectadas por Neosporosis bovina.

En 64 de las 141 fincas se diagnosticó Neosporosis bovina, lo que corresponde al 45,39 %, mientras que en las 77 fincas restantes, es decir, en el 54,61 % no se encontraron evidencias serológicas que demuestren infección por *Neospora caninum* (Figura 5).

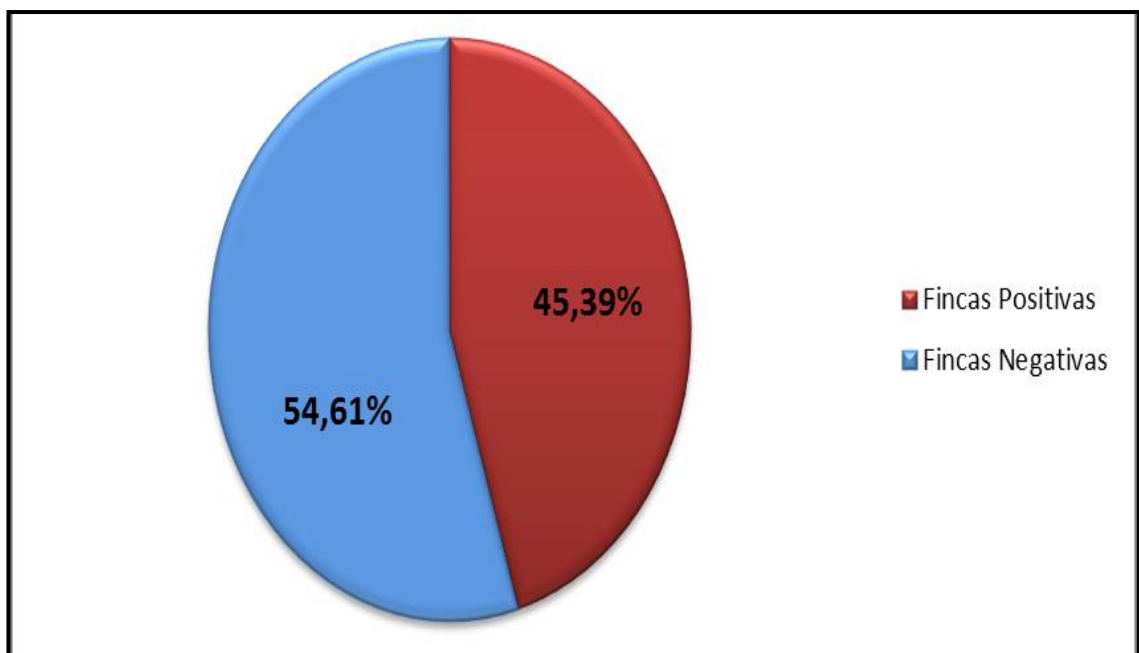


Figura 5. Porcentaje de Fincas Positivas y Negativas a Neosporosis Bovina por ELISAc en el Cantón Loja.

Las parroquias en las que se registró el mayor porcentaje de fincas infectadas al igual que el mayor número de bovinos seropositivos fueron San Sebastián, Taquil, Santiago, Jimbilla, Yangana, San Lucas y El Valle con porcentajes que superan el 50 % (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de fincas infectadas con Neosporosis bovina por parroquia.

| PARROQUIAS | Total de Fincas | Fincas Positivas | Fincas Negativas | PREVALENCIA % |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| SAN SEBASTIAN | 13 | 7 | 6 | 53.85 |
| SUCRE | 8 | 3 | 5 | 37.50 |
| TAQUIL | 13 | 7 | 6 | 53.85 |
| EL CISNE | 7 | 3 | 4 | 42.86 |
| SANTIAGO | 11 | 7 | 4 | 63.64 |
| EL VALLE | 22 | 13 | 9 | 59.09 |
| CHANTACO | 8 | 1 | 7 | 12.50 |
| JIMBILLA | 3 | 2 | 1 | 66.67 |
| MALACATOS | 9 | 3 | 6 | 33.33 |
| CHUQUIRIBAMBA | 6 | 2 | 4 | 33.33 |
| VILCABAMBA | 5 | 1 | 4 | 20.00 |
| YANGANA | 10 | 6 | 4 | 60.00 |
| SAN LUCAS | 15 | 8 | 7 | 53.33 |
| GALEL | 7 | 0 | 7 | 0.00 |
| SAN PEDRO DE VILCABAMBA | 1 | 0 | 1 | 0.00 |
| QUINARA | 3 | 1 | 2 | 33.33 |
| TOTAL | 141 | 64 | 77 | 45.39 |

Fuente: Directa

Elaboración: El Autor, 2013.

4.2. Relación entre la presencia de caninos como factor de riesgo y la presencia de Neosporosis bovina en las ganaderías del Cantón Loja.

En 79 de las 141 fincas en estudio se encontró presencia de caninos (Factor de riesgo), en 46 de las cuales se detectó la presencia de la enfermedad (Cuadro 3).

Cuadro 3. Relación entre la presencia de caninos y la positividad a Neosporosis bovina en el Cantón Loja.

| Parámetros | Fincas Positivas | Fincas Negativas | TOTAL |
|----------------------|------------------|------------------|------------|
| Presencia de Caninos | 46 | 33 | 79 |
| Ausencia de Caninos | 18 | 44 | 62 |
| TOTAL | 64 | 77 | 141 |

Fuente: Directa

Elaboración: El Autor, 2013.

Los caninos se encontraron presentes en la mayoría de las fincas diagnosticadas con Neosporosis bovina, y estuvieron ausentes en la mayoría de fincas libres de la enfermedad (Figuras 6 y 7).

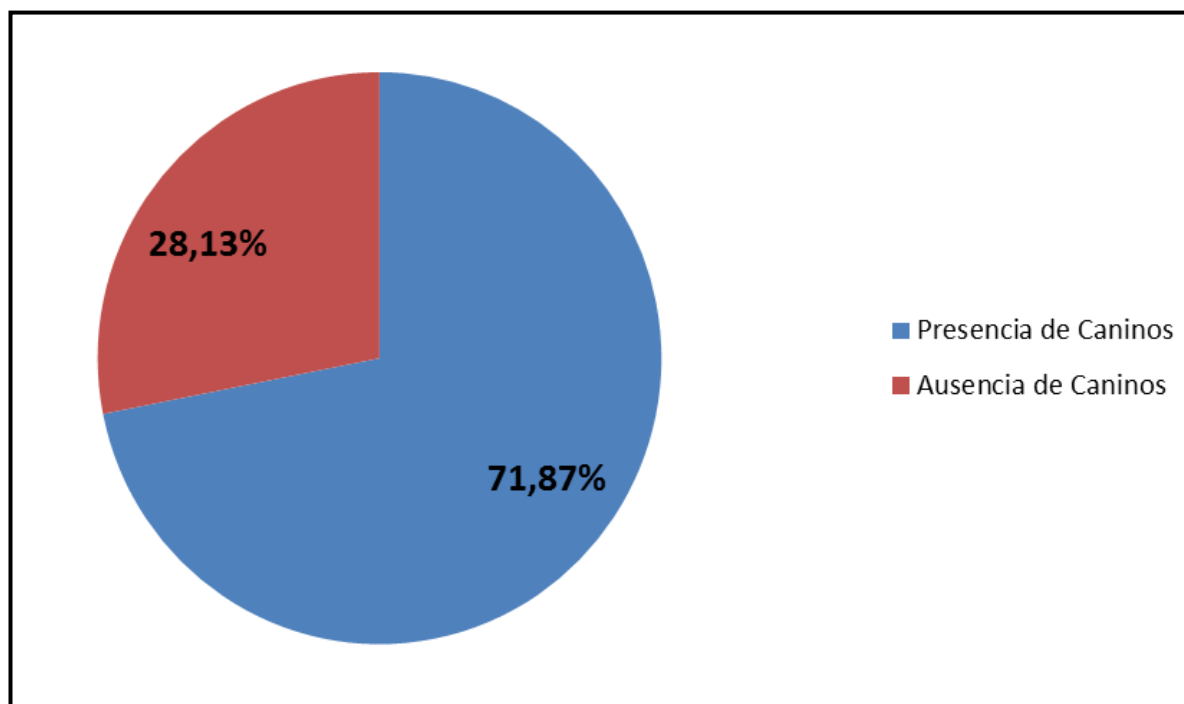


Figura 6. Porcentaje de fincas positivas a Neosporosis bovina expuestas y no expuestas al factor de riesgo (caninos)

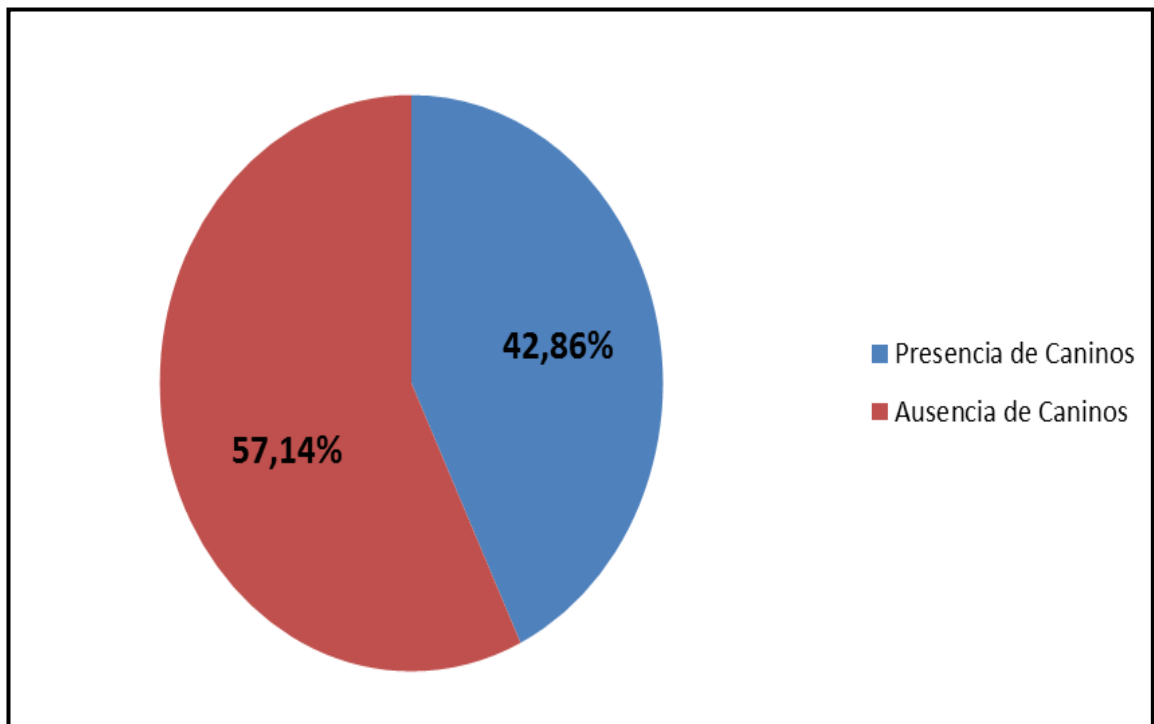


Figura 7. Porcentaje de fincas negativas a Neosporosis bovina expuestas y no expuestas al factor de riesgo (caninos)

Con estos antecedentes se estableció a través del Test exacto de Fisher que existe asociación entre las variables antes mencionadas ($p = 0,0007$); y un riesgo superior de las fincas a ser diagnosticadas con Neosporosis bovina, si están expuestas a la presencia de caninos (Odds Ratio = 3,48) (Ver anexo N° 6).

Mediante la prueba de Chi cuadrado se demostró la asociación entre las variables presencia de caninos y porcentaje de fincas positivas a neosporosis, rechazándose la hipótesis nula de independencia entre estas variable, y aceptando la hipótesis alternativa de que el porcentaje de fincas positivas es mayor en las que tuvieron canes que en las que no tuvieron ($X^2 = 11,94$ con 1 g.l.) (Ver Anexo N° 6).

4.3. Análisis de muestras fecales de caninos presentes en fincas seropositivas.

En las ganaderías en las cuales se detectó la presencia de reactores positivos a Neosporosis bovina, el análisis de muestras fecales de caninos mediante la Técnica de Faust permitió demostrar la presencia de formas parasitarias semejantes a ooquistes de *Neospora caninum* en 13 de las 46 fincas positivas, lo que corresponde al 28,26%; mientras que el 71,73 % restante, es decir, las otras 33 muestras resultaron negativas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Identificación de ooquistes de *Neospora caninum* en muestras fecales procedentes de fincas positivas a Neosporosis bovina.

| RESULTADOS | MUESTRAS ANALIZADAS | |
|------------|---------------------|------------|
| | Número | Porcentaje |
| Positivos | 13 | 28,26 % |
| Negativos | 33 | 71,74 % |
| TOTAL | 46 | 100 |

Fuente: Directa

Elaboración: El Autor, 2013

5. DISCUSIÓN

Neosporosis bovina, enfermedad producida por un parásito intracelular denominado *Neospora caninum*, cuya transmisión se produce por contacto con la especie canina y otros hospedadores naturales causa un gran número de abortos y pérdidas económicas a nivel mundial. Los resultados encontrados en el presente trabajo señalan que de un total de 650 animales muestreados, 145 resultaron positivos, lo que representa una seroprevalencia considerable del 22,31%, que indica que más de la quinta parte de la población de bovinos tomados en el estudio de las ganaderías del cantón Loja presenta evidencia de infección.

Estudios previos en los que se han empleado métodos diagnósticos similares permiten pensar que la enfermedad se encuentra muy difundida en el país ya que corroboran la presencia anticuerpos al parásito en ganaderías de la región Sierra; por ejemplo Cajamarca & Reyes (2012), en el cantón Mejía – Latacunga, reportan una seroprevalencia del 18,6% de un total de 145 muestras sanguíneas; y, Lozada (2004) en la Sierra Centro Norte del País reportó de un total de 395 muestras una seroprevalencia del 42%.

El 45,39% de las ganaderías tomadas en cuenta para la presente investigación mantienen reactores positivos a la enfermedad, es decir casi la mitad de las fincas muestreadas resultaron afectadas, lo cual se deba posiblemente a la intervención de algunos factores de riesgo como la introducción de animales de zonas con alta prevalencia de la enfermedad sin un diagnóstico serológico que se encargan de la transmisión vertical de la infección, al deficiente control sanitario en los hatos lecheros y mal manejo de abortos que predisponen al contagio y desarrollo de la infección; y, a la presencia de hospedadores intermediarios y definitivos que mantienen prevalente la enfermedad.

Si bien es cierto la transmisión transplacentaria es la forma más importante de transmisión en la especie bovina, se ha demostrado que en las ganaderías del Cantón Loja existe una asociación verdadera entre la presencia de Neosporosis bovina y la exposición a la presencia de caninos.

Para determinar si existe una correlación entre la enfermedad y el factor de riesgo, se empleó el programa estadístico "R" aplicando las pruebas de Chi cuadrado y Test exacto de Fisher, en la primera se estableció un valor de $X^2=11,94$ y un valor de p para X^2 de 0,0005 que demostraron asociación entre las variables, al igual que el valor de $p=0,0007$ calculado en función del Test de Fisher.

Sin embargo, la medida de riesgo estimada a través del cálculo de Odds Ratio, método estadístico ampliamente utilizado en las ciencias biomédicas que cuantifica el riesgo entre la ocurrencia de un evento y la vulnerabilidad a este, permitió en el presente estudio obtener un valor de 3,48 lo que se interpreta de la siguiente manera: Que las fincas expuestas al factor de riesgo (Presencia de caninos) tienen la probabilidad de enfermar en 3,48 veces más que en aquellas en las que el factor de riesgo se encuentra ausente. Estos resultados discrepan con los obtenidos por Escalona et al., (2010), en su artículo denominado "Factores de riesgo asociados a la prevalencia de Neosporosis Bovina en el municipio Bolívar del estado Yaracuy, Venezuela", en el cual menciona que no se encontró asociación estadísticamente significativa ($P > 0,05$) entre la seroprevalencia de *N. caninum* en los bovinos y la presencia de perros en la finca.

A pesar de que se ha encontrado una asociación estadística significativa entre la exposición al factor de riesgo y la ocurrencia de la enfermedad, los resultados obtenidos mediante el análisis coprológico no evidencian en todos los casos la presencia de las formas parasitarias responsables de la transmisión al hospedador intermediario, tal es así que se recogieron 46

muestras de heces de perros en las ganaderías positivas, encontrándose formas parasitarias similares a ooquistes de *Neospora caninum* únicamente en 13 de ellas (28,26%) mediante la Técnica de Faust, lo que puede ser explicado por su baja sensibilidad en los casos de excreción intermitente, lo que podría llevar a una subestimación de la frecuencia de esta infección (Carvajal et al., 2007)

Aunque la infección por transmisión horizontal del ganado bovino posiblemente tiene lugar por la ruta orofecal, el hospedador definitivo elimina ooquistes (McAllister et al., 1998) que contaminan el pasto, forrajes, agua de bebida o piensos almacenados. Sin embargo, la presencia de ooquistes en perros naturalmente infectados se ha señalado en muy pocas ocasiones (Vázquez, 2007), por lo que se recomienda realizar estudios más profundos para confirmar el papel del hospedador definitivo en la transmisión de la enfermedad, con métodos de diagnóstico directos más sensibles y específicos como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o aislamiento del parásito.

6. CONCLUSIONES

El análisis de resultados obtenidos en la presente investigación, condujo a proponer las siguientes conclusiones:

- La prevalencia de Neosporosis bovina en el Cantón Loja es del 22,31 %, habiéndose diagnosticado la enfermedad en el 45,39 % de las fincas muestreadas.
- Las parroquias más afectadas son: San Sebastián, el Valle, Jimbilla y San Lucas.
- La presencia de caninos es un factor de riesgo para la ocurrencia de la enfermedad, pudiendo infectarse mayormente las fincas expuestas.
- La técnica coproparasitaria empleada en la presente investigación permitió la identificación de formas parasitarias semejantes a ooquistes de *Neospora caninum* únicamente en el 28,26 % de las muestras fecales de caninos procedentes de fincas positivas.
- Los resultados de laboratorio fueron comunicados personalmente a los propietarios de las fincas en donde se realizó el muestreo, a quienes además se brindó asesoría sobre el control de la enfermedad.

7. RECOMENDACIONES

- Recolectar y eliminar adecuadamente fetos abortados y placentas para evitar la infección de los caninos, por ser ellos los responsables de la transmisión horizontal de la enfermedad.
- Implementar programas de erradicación del parásito, mediante la eliminación progresiva de las hembras infectadas y, con particular énfasis, de las becerras nacidas infectadas (transmisión vertical), como medida para luchar contra esta enfermedad.
- Evitar el acceso de caninos a las fuentes de agua y alimento del ganado bovino disminuyendo así la fuente de transmisión horizontal del parásito mediante la vía oro-fecal.
- Proponer a futuro investigaciones que determinen la presencia de *Neospora caninum* en las ganaderías de la zona, a través del diagnóstico directo como histopatología y pruebas moleculares en fetos abortados, o aislamiento del parásito.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alarico, 2012. "Determinación de Seroprevalencia de Anticuerpos a Neospora Caninum en Bovinos de Leche del Distrito de Locumba-Tacna 2012". Disponible en [http://tesis.unjbg.edu.pe:8080/bitstream/handle/unjbg/140/34_Alari co_Zeballos_DA_FCAG_Medicina_Veterinaria_Zootecnia_2012.p df?sequence=1.pdf](http://tesis.unjbg.edu.pe:8080/bitstream/handle/unjbg/140/34_Alari co_Zeballos_DA_FCAG_Medicina_Veterinaria_Zootecnia_2012.pdf?sequence=1.pdf). Recuperado el 25 de junio del 2013
2. Arauco, 2013. "Factores de Riesgo Asociados a Neosporosis Bovina en la Ganadería Lechera del Valle del Mantaro". Disponible en [http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/neosporosis_bovina_arauco. pdf](http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/neosporosis_bovina_arauco.pdf). Recuperado el 24 de noviembre del 2013
3. Bañales et al., 2012. "Neosporosis". Disponible en: http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=neosporosis%20por% 20dr.%20pedro%20ba%C3%B1ales&source=web&cd=2&cad=rja &ved=0CC0QFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.santaelena.com.u y%2Fandocasociado.aspx%3F397%2C7091&ei=Hp- 2UZeUKMeViALU4YGYCQ&usq=AFQjCNEkTtuxPZ2uB_WRkQO RpEqyYapKCg&bvm=bv.47534661,d.cGE. Recuperado el 22 de mayo del 2013
4. Cajamarca y Reyes, 2012. "Determinación de la incidencia de Sarcocistosis Bovina en Animales Positivos a Neosporosis, en trece haciendas ganaderas en Machachi, cantón Mejía". Disponible en <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/818/1/T-UTC- 1177.pdf>. Recuperado el 25 de junio del 2013

5. Carvajal et al., 2007. Características diagnósticas de tres métodos coprológicos para detectar *Giardia* spp. en caninos, utilizando un ELISA de captura como prueba de oro. Disponible en https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&ved=0CDoQFjAD&url=http%3A%2F%2Fwww.revistas.una.ac.cr%2Findex.php%2Fveterinaria%2Farticle%2Fdownload%2F3677%2F3532&ei=2jmnUrrLBcLAKQfhvYC4DQ&usq=AFQjCNFxtC_83KjNbvJkROEBILGf8mdxA. Recuperado el 10 de diciembre del 2013.
6. César, 2005. “Neosporosis”. Disponible en: http://www.planagro.com.uy/publicaciones/revista/R98/R98_36.htm. Recuperado el 26 de noviembre 2013
7. Cruz, 2011. “Identificación del Parasito “*Neospora caninum*” en Bovinos por medio del Método de ELISA, en las haciendas ganaderas de cantón Tulcán en la provincia del Carchi”. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/123456789/402/1/TMVZ-2011-11.pdf>. Recuperado el 10 de junio del 2013
8. Escalona et al., 2010. “Factores de riesgo asociados a la prevalencia de Neosporosis Bovina en el municipio Bolívar del estado Yaracuy, Venezuela”. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0798-72692010000200007&script=sci_arttext. Recuperado el 25 de noviembre de 2013
9. Fernandez, 2003. “Patogenia de la neosporosis en el feto Bovino y en un modelo murino experimental”. Disponible en:

<http://biblioteca.ucm.es/tesis/vet/ucm-t27257.pdf>. Recuperado el 22 de mayo del 2013

10. Fernández et al., 2010. "Neosporosis Bovina". Disponible en: http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=identificacion%20y%20caracterizacion%20de%20antigenos%20de%20neosporea%20caninum&source=web&cd=17&ved=0CE8QFjAGOAo&url=http%3A%2F%2Fbiblio.unicen.edu.ar%2F%3Fp%3Dget_document%26id%3D58888-1&ei=mzy2UZLaManK0wGxoYDYDA&usg=AFQjCNFUpiBOvCymwanUjPe9CBtplvP7YA. Recuperado el 22 de mayo del 2013
11. Fort, 2004. "*Neospora caninum*: Estudio seroepidemiológico en bovinos de la provincia de La Pampa". Disponible en: http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=neosporea%20caninum%3A%20estudio%20seroepidemiol%C3%B3gico%20en%20bovinos%20de%20la%20provincia%20de%20la%20pampa&source=web&cd=2&cad=rja&ved=0CC4QFjAB&url=http%3A%2F%2Finta.gob.ar%2Fdocumentos%2Fneosporea-caninum-estudio-seroepidemiologico-en-bovinos-de-la-provincia-de-la-pampa%2F_at_multi_download%2Ffile%2Fpubli52.pdf&ei=PaK2UfiiLKauIALi3IDwDg&usg=AFQjCNHy3HgXExUjgbe9nID36iBRnurAqw&bvm=bv.47534661,d.cGE. Recuperado el 15 de mayo del 2013
12. Fredes, 2002. "Algunos Antecedentes sobre *Neospora caninum* y Neosporosis". Disponible en <http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/index.php/MMV/article/viewFile/1026/907>. Recuperado el 04 de junio del 2013

13. Gamón, 2010. "Detección de Anticuerpos de *Neospora caninum* en la zona norte de la cuenca lechera del Departamento de Santa Cruz". Disponible en: http://www.fcv.uagrm.edu.bo/sistemabibliotecario/doc_tesis/GAMON%20A.%20EDUARDO-20101119-105009.pdf. Recuperado el 29 de mayo del 2013
14. Álvarez, 2003. "Identificación y Caracterización de Antígenos de *Neospora caninum*" con interés Inmunodiagnóstico en Bovinos". Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/vet/ucm-t26646.pdf>. Recuperado el 22 de mayo del 2013
15. Ramírez, 2008. "Neosporosis Bovina". Disponible en: <http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/jspui/bitstream/123456789/553/1/NEOSPOROSISBOVINA.pdf>. Recuperado el 11 de junio del 2013
16. Jara, 2009. "Determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en el distrito de Jenaro Herrera, Loreto". Disponible en: http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2010/jara_vj/pdf/jara_vj.pdf. Recuperado el 15 de mayo del 2013
17. Larenas, 2005. "Neosporosis en bovinos y caninos". Disponible en: <http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET1-2005/PDF/Mepavet08.pdf>. Recuperado el 15 de mayo del 2013
18. Lozada, 2004. "*Determinación de la presencia de anticuerpos a Neospora caninum en hatos lecheros de la sierra Centro Norte del Ecuador, por Prueba Inmunoenzimática, para diagnosticar neosporosis bovina*". Disponible en

http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=diagnostico%20de%20neosporosis%20en%20el%20ecuador&source=web&cd=2&cad=rja&ved=0CCwQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.msd-salud-animal.ec%2Fbinaries%2FResumen_Neospora__revista__1__tcm46-28370.doc&ei=IbXIUeTpllro9gS0kYCIAG&usg=AFQjCNFEtPM6LyZNEe45HVXEiynVKF9KfA&bvm=bv.48293060,d.eWU.docx
Recuperado el 24 de junio del 2013

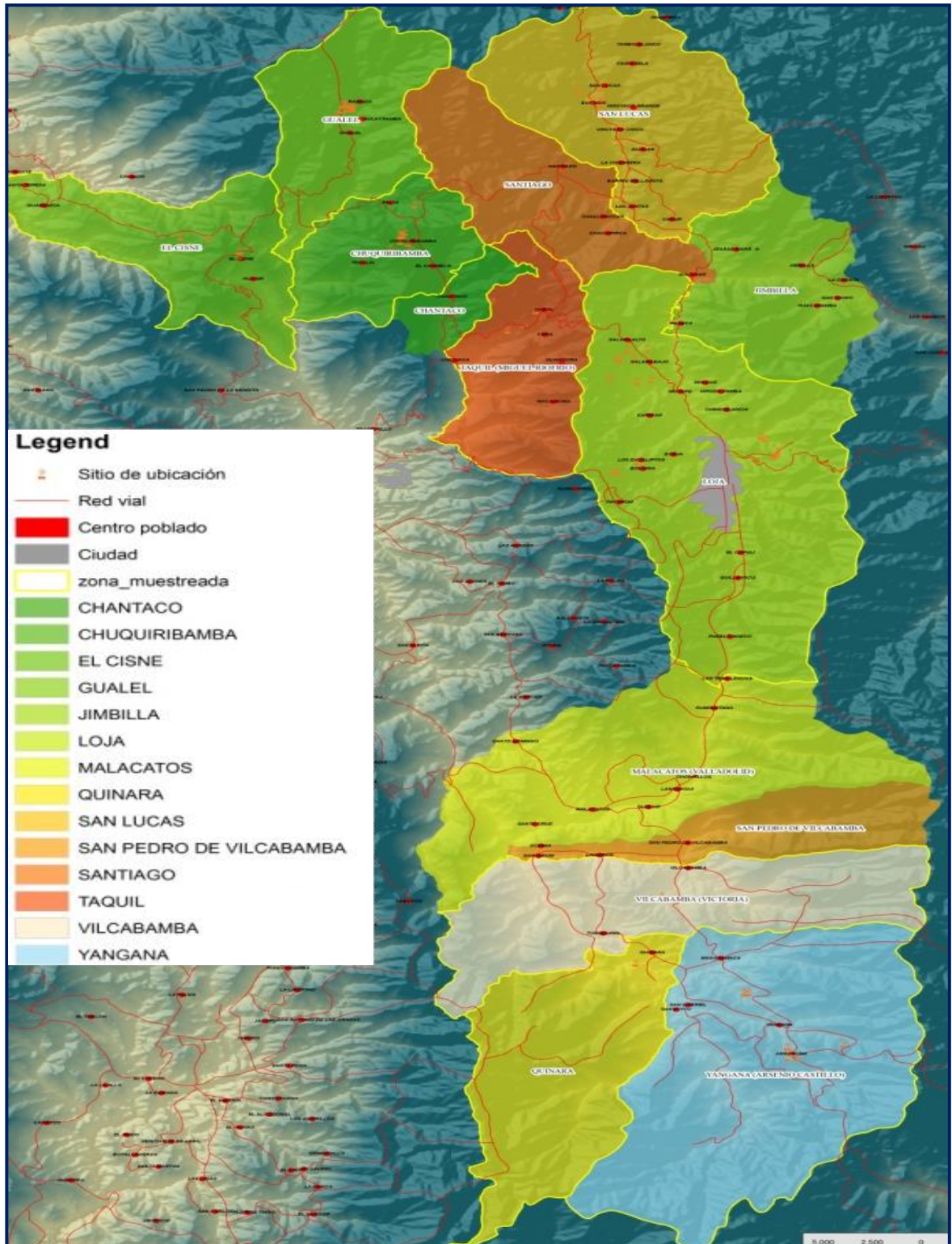
19. Lützel Schwab, 2005. "Pruebas de Interacción Primaria". Disponible en <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Inmunologia/Documentos/lparse.pdf>. Recuperado el 04 de junio del 2013
20. Maldonado, 2013. "Relación entre la Seroconversión Positiva de Vacas Holstein a Neospora Caninum y El Aborto, Muerte Fetal Temprana, Momificación Fetal, Gestación a Término, y Mortalidad Neonatal". Disponible en <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3409/1/TESIS.pdf>. Recuperado el 24 de noviembre del 2013
21. Moore y Odeón, 2001. "Neosporosis Bovina". Disponible en <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3427/>. Recuperado el 24 de noviembre del 2013
22. Moore et al., 2005. "Neosporosis Bovina: Conceptos Generales, Inmunidad y Perspectiva para la Vacunación". Disponible en <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v37n4/v37n4a11.pdf>. Recuperado el 15 de mayo del 2013

23. Obando et al., 2010, "*Neospora caninum* en un rebaño lechero y su asociación con el aborto". Disponible en http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592010000300003. Recuperado el 25 de junio del 2013
24. Odeón et al., 2001. "Neosporosis Bovina". Disponible en: <http://neosporosis.wikispaces.com/file/view/Ncanimun.pdf>. Recuperado el 11 de junio del 2013
25. Sánchez, 2004. "Curso de Introducción a la Inmunología Porcina". Disponible en: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca051.htm>. Recuperado el 22 de mayo del 2013
26. Sócrates et al., 2010. "Riesgo relativo y Odds ratio ¿Qué son y cómo se interpretan?". Disponible en: https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&ved=0CFIQFjAF&url=http%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Fpublication%2F251573463_Riesgo_relativo_y_Odds_ratio_Qu_son_y_cmo_se_interpretan%2Ffile%2F3deec51f1399db98ea.pdf&ei=jUahUuKhFsvokAeAnYCQCQ&usg=AFQjCN EknF3lCwtl8KF6q6eQXEToC_NlOW&sig2=Z_1lvN64T3f86FZ3NwyBYw&bvm=bv.57155469,d.eW0.pdf. Recuperado el 02 de diciembre de 2013
27. Vázquez, 2007. "Presencia De *Neospora Caninum* Y Otros Parásitos Gastrointestinales En Perros Procedentes De Poblaciones De Riesgo En España". Disponible en <http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/viewFile/RCCV0707230394A/22692>. Recuperado el 02 de diciembre de 2013

28. VIRBAC, 2011. "Procedimientos y técnicas para la realización de estudios coproparasitológicos". Disponible en <http://www.webveterinaria.com/virbac/news25/compania.pdf>. Recuperado el 06 de junio del 2013

9. ANEXOS

Anexo Nº 1. Ubicación de las parroquias Urbanas y Rurales del Cantón Loja.



Anexo N° 2. Encuesta Epidemiológica



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA SOBRE NEOSPOROSIS

IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA EXPLOTACIÓN:

No. Encuesta ____/____/____

Encuestador: _____ Fecha: ____/____/20____

Nombre de la UPA: _____

Propietario: _____ Telf (s) _____

Provincia: _____ Cantón: _____ Parroquia: _____

Localidad: _____

DATOS GENERALES DE LA EXPLOTACIÓN

1. ¿Qué tipo de producción tiene su finca? Leche Carne Mixta

2. Moviliza animales entre propiedades: Si No

Observaciones: _____

3. ¿Cuál es la procedencia de los animales de remplazo?

Propios Feria Importa Otro _____

4. ¿Conoce si los animales de remplazo tienen certificación sanitaria?

Sí (Cuál) _____ No No sabe

5. ¿Cuál es el destino final del estiércol?

Acequia o río Pastos Cultivos Humus

6. ¿Existen perros en el predio?

Sí No

7. ¿Los perros pasan en contacto con los bovinos?

Sí No

Observaciones: _____

SISTEMA DE REPRODUCCIÓN

8. ¿Existe un lugar específico para las pariciones?

Sí (En dónde) _____ No

9. ¿Se produjeron abortos en los bovinos en el último año?

Sí (Número de abortos): _____ No No sabe

10. ¿En qué periodo de la gestación tuvo lugar?

11. ¿Han presentado o presentan los bovinos, alguno de éstos signos? :

Fiebre Mortinatos Nacimiento de terneros débiles

Maceración fetal Repetición de celos Trastornos oculares

12. Signos clínicos en terneros al nacer.

Incoordinación muscular Parálisis muscular Orbitas oculares salidas

CONTROL

13. ¿Cuál es el destino de los abortos y tejidos abortados?

Consume Entierra Incinera

Bota a la basura Envía al laboratorio Deja en el campo

14. ¿Vacuna a los bovinos contra Neospora?

Sí No

Porque: _____

15. ¿Realiza control de enfermedades continuamente a los perros?

Sí No

Porque: _____

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

Anexo N° 3. Recolección de Muestras Sanguíneas



Reconocimiento y sujeción de animales.



Preparación de animales para recolectar sangre.



Extracción de sangre para realizar los análisis correspondientes.

Anexo N° 4. Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas Competitivo (ELISAc) para Detección de Anticuerpos a *Neospora caninum* en Suero Bovino.



Muestras sanguíneas y extracción de suero para realizar la prueba de ELISAc



Prueba de ELISA

neosporosis 460-505.xls [Modo de compatibilidad] - Microsoft Excel

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------|-----------|----------|----------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|
| Results | | | | | | | | | | | | |
| A | 0.322 | 0.203 | 1.046 | 1.124 | 0.129 | 0.673 | 0.206 | 1.041 | 0.784 | 0.158 | 1.269 | 1.236 |
| B | 0.346 | 0.183 | 1.043 | 1.145 | 0.124 | 0.631 | 0.201 | 1.043 | 0.826 | 0.154 | 1.282 | 1.213 |
| C | 0.986 | 0.333 | 0.203 | 0.787 | 0.31 | 1.11 | 0.145 | 0.379 | 0.223 | 1.19 | 1.03 | 1.019 |
| D | 0.392 | 0.206 | 0.872 | 0.373 | 1.167 | 0.271 | 0.356 | 0.161 | 1.163 | 1.097 | 1.005 | 1.015 |
| E | 0.287 | 0.305 | 1.038 | 1.134 | 1.042 | 0.888 | 1.067 | 0.656 | 0.21 | 0.943 | 1.058 | 1.015 |
| F | 0.269 | 0.212 | 1.147 | 1.178 | 0.96 | 0.859 | 1.058 | 0.616 | 0.247 | 0.972 | 1.094 | 1.115 |
| G | 0.939 | 0.575 | 0.407 | 0.317 | 0.801 | 0.141 | 0.232 | 0.319 | 0.957 | 0.975 | 0.19 | 1.027 |
| H | 0.94 | 0.661 | 0.424 | 0.161 | 0.73 | 0.129 | 0.24 | 0.31 | 0.992 | 0.997 | 0.179 | 0.74 |
| A | 79.4118 | -6.08519 | -13.9959 | 86.9168 | 31.7444 | 79.1075 | -5.57809 | 20.4868 | 83.9757 | -28.7018 | -30.426 | |
| B | 81.4402 | -5.78093 | -16.1258 | 87.4239 | 36.0041 | 79.6146 | -5.78093 | 15.2272 | 84.3813 | -30.0203 | -23.0223 | |
| C | 66.2272 | 79.4118 | 20.1626 | 86.5598 | -12.5711 | 85.2941 | 61.5019 | 77.3834 | 20.6897 | -4.46247 | -3.34688 | |
| D | 67.3428 | 60.2434 | 79.1075 | 11.5619 | 62.1704 | -18.357 | 72.5152 | 63.8945 | 83.6714 | -17.9513 | -11.2576 | -1.92698 |
| E | 70.8925 | 68.9655 | -30.3245 | -15.0101 | -5.67951 | 9.93915 | -8.21501 | 33.4686 | 76.7018 | 4.36105 | -7.30223 | -2.94118 |
| F | 72.7181 | 78.499 | -16.3286 | -19.4726 | 2.63692 | 12.8803 | -7.30223 | 37.5254 | 74.9493 | 1.41988 | -10.9533 | -13.0832 |
| G | 4.76673 | 41.6836 | 58.7221 | 67.8499 | 18.7627 | 85.6998 | 76.4706 | 67.6471 | 2.94118 | 1.11562 | 80.7302 | -4.15822 |
| H | 4.66531 | 32.8615 | 56.998 | 83.6714 | 25.9635 | 86.9168 | 75.8592 | 68.5598 | -0.60852 | -1.11562 | 81.6458 | 24.9493 |
| A | Control + | 462 | 466 | 470 | 474 | 478 | 482 | 486 | 490 | 494 | 498 | 502 |
| B | Control + | 462 | 466 | 470 | 474 | 478 | 482 | 486 | 490 | 494 | 498 | 502 |
| C | Control - | 463 | 467 | 471 | 475 | 479 | 483 | 487 | 491 | 495 | 499 | 503 |
| D | Control - | 463 | 467 | 471 | 475 | 479 | 483 | 487 | 491 | 495 | 499 | 503 |
| E | 460 | 464 | 468 | 472 | 476 | 480 | 484 | 488 | 492 | 496 | 500 | 504 |
| F | 460 | 464 | 468 | 472 | 476 | 480 | 484 | 488 | 492 | 496 | 500 | 504 |
| G | 461 | 465 | 469 | 473 | 477 | 481 | 485 | 489 | 493 | 497 | 501 | 505 |
| H | 461 | 465 | 469 | 473 | 477 | 481 | 485 | 489 | 493 | 497 | 501 | 505 |

Muestras analizadas por el programa GEN 5

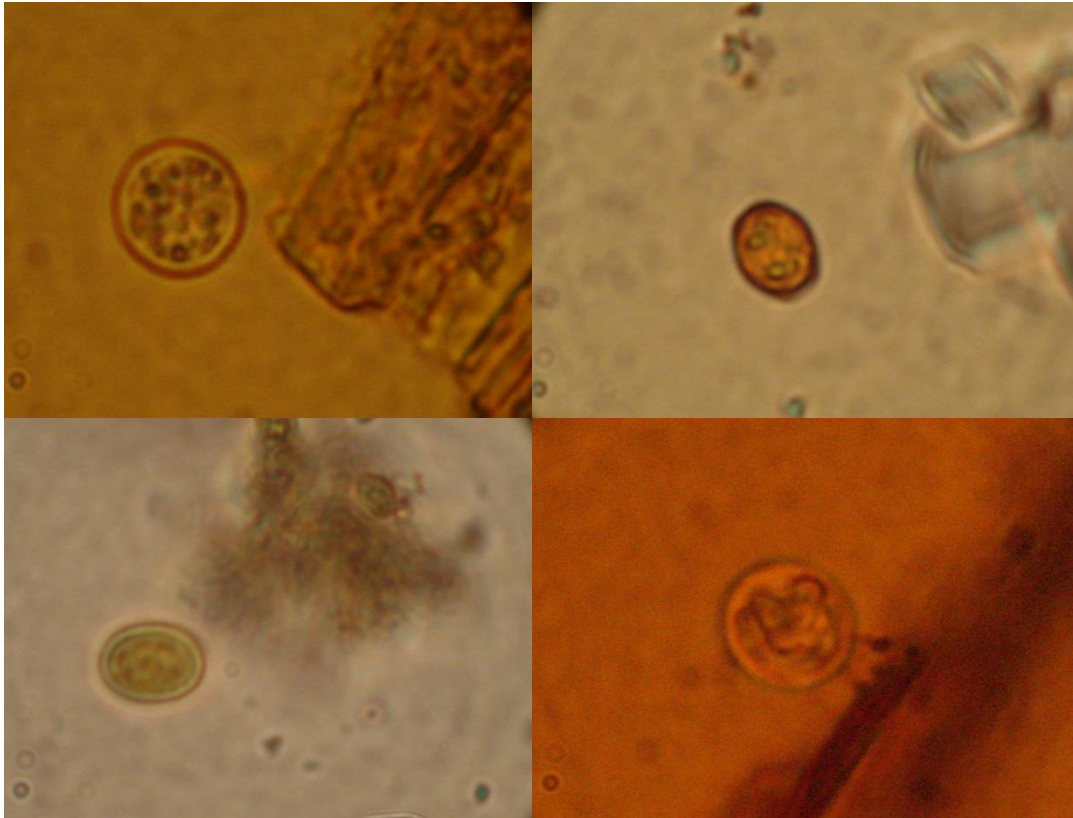
Anexo N° 5. Técnica de Faust para Detección de Ooquistes de *Neospora caninum*



Materiales para realizar análisis de heces de canino



Preparación y tiempo de espera para análisis de muestras de heces caninas



Resultados obtenidos por la Técnica de Faust

Anexo N° 6. Pruebas Estadísticas utilizadas para obtener el cálculo de Correlación.

| TEST EXACTO DE FISHER | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| FACTOR DE RIESGO | Oportunidad | Intervalo de Confianza IC 95 % | Valor de (p) | Oportunidad Relativa |
| Presencia de Caninos | 1,39 | (1,500320- 7,387526) | 0,0007 | 3,48 |
| Ausencia de caninos | 0,40 | | | |
| CHI CUADRADO | | | | |
| X² Calcular | Grados de Libertad | X² Tabular | Valor de (p) | |
| 11,94 | 1 | 3,841 | 0,0005 | |

Anexo N° 9. Difusión de Resultados

