

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA.**



“DETERMINACIÓN SEROLÓGICA DE *Neospora caninum* EN *Canis domesticus* EN TRES GANADERÍAS LECHERAS DEL DEPARTAMENTO DE SONSONATE, DE EL SALVADOR.”

**PARA OPTAR AL TITULO DE:
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.**

**PRESENTAN:
GLORIA ELVIRA GRANILLO VILLEGAS.
JUAN CARLOS MARTINEZ.**

SAN SALVADOR, OCTUBRE DE 2008.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR: ING. AGR. RUFINO ANTONIO QUEZADA SANCHEZ.

SECRETARIO GENERAL: LIC. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHAVEZ.

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS.

DECANO: ING. AGR. REYNALDO ADALBERTO LOPEZ LANDAVERDE.

SECRETARIO: ING. AGR. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA.

M.V. Z. OSCAR LUIS MELENDEZ CALDERON.

DOCENTES DIRECTORES

LIC. OMAR ALBERTO AGUILAR GUEVARA.

M.V.Z. GUSTAVO ANTONIO FIGUEROA LOPEZ

RESUMEN

En El Salvador no existen reportes sobre Neosporosis Canina por lo que el presente estudio tuvo como objetivo investigar la presencia de anticuerpos en suero canino, ya que el perro es el hospedero definitivo, y vector de la Neosporosis.

Los sueros de 103 perros provenientes de los alrededores de 3 ganaderías lecheras del Departamento de Sonsonate, fueron recolectados y analizados por la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), para demostrar la presencia de anticuerpos Anti-***Neospora caninum***.

Del los sueros colectados el 11% (11) de ellos se detectó la presencia de anticuerpos. De las tres poblaciones caninas analizadas, en dos de ellas se encontraron seropositivos, cabe mencionar que en la ganadería que no hubo reacción positiva a la prueba, existe un plan de erradicación y control de perros. Además se estratificó las localidades de las lecherías dos de ellas rurales y la restante urbano-marginal, esto según las características particulares de cada una de ellas.

Según la prueba estadística: Chi-cuadrado, la localidad, edad y sexo no existe relación o dependencia con respecto a la seropositividad de Neosporosis.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS:

Por ser el guía de nuestras vidas proveernos gracias a sus bendiciones y de rodearnos de cariño y apoyo de tantas personas en nuestro camino.

A NUESTRAS FAMILIAS:

Por el apoyo incondicional y ser aliciente de nuestras vidas, y haber sido parte fundamental para desarrollo finalización de nuestra carrera.

NUESTROS ASESORES:

M.V.Z. Gustavo Antonio Figueroa López: Por haber sido parte de nuestro desarrollo profesional no solo como docente sino también como amigo. Por su tiempo, responsabilidad y colaboración en la elaboración de este trabajo.

Lic. Omar Alberto Aguilar Guevara: Por su Pedagogía e interés durante la elaboración de esta Investigación y hacerla cada vez mejor. Y por su amabilidad que nos ayudaron durante la realización de este estudio. Gracias por todo su apoyo.

A LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS:

Por sembrar disciplina, responsabilidad y experiencia durante todo el proceso de nuestra carrera.

AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN SALUD (CENSALUD):

Por abrir las puertas de tan importante centro de investigación, gracias al Dr. Cedillos, Srta. Zoila Cruz Mejía Cruz y Sra. Ana Margarita Pérez por su atención, servicio y amabilidad.

MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL:

Especialmente a las Unidades de Salud de Caluco principalmente a la Dra. Olivo a los señores promotores y Unidad de Salud de Sonsonate al Sr. Coto.

A LOS MEDICOS VETERINARIOS:

Luis Ernesto Romero y Kevin Cuellar Lemus, Por su especial interés y participación de nuestro trabajo de investigación.

A LOS PROPIETARIOS DE LAS GANADERIAS:

Quienes nos brindaron su colaboración haciendo posible la realización de nuestro seminario de graduación.

A VETERINARY MEDICAL RESEARCH & DEVELOPMENT (VMRD®):

Principalmente al Sr. Luke Brown por haber colaborado y aportado interés de promover la culminación de nuestra investigación.

Y MUY ESPECIALMENTE A MULTIPPECUARIOS S.A. DE C.V. e INTERVET MEXICO DIVISIÓN CENTRO AMERICA, por su interés y valiosa colaboración en promover el desarrollo de ésta investigación, al Ing. Y M.V.Z. Víctor Recinos.

A TODOS ELLOS MUCHAS GRACIAS

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO, por guiarme e iluminarme día a día, sin su ayuda no hubiese concluido esta investigación.

A MI VIRGEN DE GUADALUPE, por escuchar mis todas y cada una de mis oraciones e inspirar mi trabajo.

A MIS PADRES: GLORIA ESTHELA VILLEGAS DE GRANILLO y NICOLAS GRANILLO CAMPOS, por todo su amor, comprensión, esfuerzo y sacrificio, permitiéndome llegar a culminar mis metas.

A MIS HERMANA/OS: MECEDES CONCEPCION GRANILLO DE ESCOBAR y GERARDO ALEXANDER GRANILLO VILLEGAS, por estar siempre a mi lado y darme fuerzas.

A MIS AMIGAS/OS: JUAN CARLOS, IVON, FRANCIS, MARIA JOSE, ILLE, MARIACLAU, PAO, IRENE, TOÑO, FAUSTO, ARTURO, EDGAR y muchos más, que siempre me animaron y estuvieron pendientes de mí.

A TODA MI FAMILIA.

GRACIAS.

GLORIA ELVIRA GRANILLO VILLEGAS.

DEDICATORIA

A DIOS, por ser el guía e iluminar la senda de mi vida, permitirme estar en este mundo al lado de buenas personas.

A MIS PADRES: RAFAEL ERNESTO BARRERA MOTTO (Q.E.P.D.) Y ANA MARIA MARTINEZ, por darme todo el amor, sacrificio, enseñarme a compartir y devolver todo lo recibido con toda persona que lo necesite.

A MI ESPOSA: PERLA MORENA PINEDA: por el amor y hacer el sacrificio de dar su tiempo, y regalarme a los tesoros de mi vida.

A MIS HIJOS: FERNANDO Y MARCELO MARTINEZ: dar fuerzas en los momentos de flaqueza.

A MIS TIOS: PBRO. MANUEL BARRERA MOTTO, VILMA BARRERA, ROSA BARRERA Y LUISA ESTER MARTINEZ por compartir buenos y malos momentos de mi vida.

A TODA MI FAMILIA.

A MIS AMIGOS: DAVID, GLORIA, ULISES, CHINO, EDUARDO, VIVI, RAFAEL, ILEANA, CHICO, CLAUDIA, KELLY, IVON, BAUDILIO, IRENE, PAOLA, RIGO, MARIA, FRAN, CHUMBY, EDGARDO, JOAN, REINA, WALTER, MOY, VICTOR por compartir gratos momentos y estuvieron pendientes de mi.

GRACIAS.

JUAN CARLOS MARTINEZ.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	IV
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VII
ÍNDICE	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE CUADROS	XV
INDICE DE TABLAS	XVI
ÍNDICE DE GRAFICOS	XVI
1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	2
2.1. Definición	2
2.1.1. Neosporosis Canina	3
2.1.2. Neosporosis en Bovinos	3
2.2. Historia	4
2.3. Morfología	5
2.3.1. Taxonomía	7

2.4. Composición Proteica y Antigénica	7
2.5. Medio Ambiente	8
2.6. Ciclo de Vida	9
2.7. Transmisión	12
2.7.1. Transmisión Vertical	13
2.7.2. Transmisión Horizontal	13
2.8. Patogenia	14
2.9. Signos clínicos	17
2.9.1. Signos clínicos en los perros	17
2.9.2. Signos clínicos en los bovinos	18
2.10. Lesiones	20
2.10.1. Lesiones de la enfermedad neuromuscular del perro	20
2.10.2. Lesiones en los fetos abortados y en terneros infectados	21
2.11. Epidemiología	22
2.11.1. Prevalencia y distribución geográfica	23
2.12. Diagnóstico	25

2.12.1. Diagnóstico de la Neosporosis canina	26
2.12.1.1. Serología	26
2.12.1.2. Microscopia Óptica	27
2.12.1.3. Inmunohistoquímica	27
2.12.1.4. Microscopía	27
2.12.1.5. Reacción en Cadena de Polimerasa	28
2.12.1.6. Aislamiento	28
2.12.2. Diagnóstico en Bovinos	28
2.12.2.1. Diagnostico del Aborto Bovino	28
2.12.2.2. Diagnostico en Bovinos Adultos	29
2.12.2.3. Diagnostico Diferencial	31
2.13. Tratamiento	31
2.14. Prevención y Control	32
3. Materiales y Métodos	33
3.1. Generalidades	33
3.1.1. Ubicación geográfica	33
3.1.2. Duración de La Investigación	33
3.1.3. Tipo de Explotación	33

3.2. Metodología estadística	34
3.2.1. Variables a Estudiar	34
3.3. Prueba de Chi – Cuadrada (X^2)	34
3.4. Metodología de campo	35
3.4.1. Materiales y Equipo	36
3.4.2. Toma de muestra	36
3.5. Metodología de Laboratorio	37
3.5.1. Materiales y Equipo	37
3.5.2. Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	37
3.5.2.1. Material Requerido	40
3.5.2.2. Equipo	41
3.5.2.3. Metodología de Laboratorio	41
3.5.2.4. Interpretación de Resultados	42
4. Resultados	43
5. Discusión de Resultados	44
6. Conclusiones	46
7. Recomendaciones	47
8. BIBLIOGRAFIA	49
ANEXOS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estadios de <i>Neospora caninum</i>	6
Figura 2. Ciclo de Vida de <i>Neospora caninum</i>	11
Figura A1. Ubicación Geográfica de las Ganaderías Lecheras estudiadas	64
Figura A2. Perros con libre acceso a las Instalaciones	65
Figura A3. Perros en área de parto	65
Figura A4. Perro en área de pastos de corte destinados al hato	66
Figura A5. Vaca con encaste predominante de Holstein	66
Figura A6. Bovinos con propósito de engorde	67
Figura A7. Formato de encuesta	68
Figura A8. Toma de muestra a perro que permanecía en ganadería ...	70
Figura A9. Muestras de suero identificado	71
Figura A10. Congelador indicando la temperatura indicada	71
Figura A11. Lámina sustrato FA <i>Neospora caninum</i>	72
Figura A12. Dilución de sueros	72

Figura A13. Controles positivo y negativo. Kit de diagnostico	73
Figura A14. Colocación de sueros diluidos en placa	73
Figura A15. Mapa para identificación de láminas y sueros	74
Figura A16. Incubación de las placas	75
Figura A17. Lavado de las laminas en frascos koplín	75
Figura A18. Secado de lámina con papel absorbente especial	76
Figura A19. Aplicación del líquido de montaje	76
Figura A20. Observación de la lámina con microscopio	77
Figura A21. Fluorescencia completa del taquizoíto de <i>N. caninum</i>	77

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CUADRO A1. Prueba de Chi – cuadrada (x^2). Presencia y ausencia de anticuerpos contra <i>Neospora caninum</i>	79
CUADRO A2. Prueba de Chi – cuadrada (x^2). Presencia de anticuerpos de acuerdo a edad y sexo de los caninos	80
CUADRO A3. Prueba de Chi – cuadrada (x^2). Presencia de anticuerpos contra <i>Neospora caninum</i> según las localidades y Sexo de los perros	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Taxonomía de <i>Neospora caninum</i>	7
TABLA 2. Seroprevalencia individual de la infección por <i>N. caninum</i> en el ganado bovino de aptitud lechera	24
TABLA 3. Seroprevalencia de la infección por <i>N. caninum</i> en bovinos para carne	25
TABLA 4. Aislamientos de <i>Neospora caninum</i>	30

ÍNDICE DE GRAFICOS.

	Página
GRAFICO 1. Distribución según el sexo de la población muestreada	78
GRAFICO 2. Distribución de las edades de los perros muestreados	78

1. INTRODUCCION.

Desde el descubrimiento del *Neospora caninum* a fines de la década del ochenta, su importancia se ha ido incrementando a través de los años. Actualmente la neosporosis afecta principalmente a los bovinos y los perros. Sin embargo se ha demostrado que *N. caninum* era ya causante de enfermedad en estas especies desde hace mucho tiempo. En el ganado lechero, la neosporosis actualmente es considerada como una de las principales causas de aborto y por lo tanto considerada una enfermedad de gran importancia económica.

La Neosporosis, es una de las causas más importantes de fallo reproductivo, aborto y mortalidad neonatal en el ganado vacuno, además de problemas neuromusculares en el perro. Esta enfermedad es producida por *Neospora caninum*, un protozoo del phylum *Apicomplexa*, familia *Sarcocystidae*. Los bovinos, ovinos, caprinos y aun los equinos son huéspedes intermediarios donde *Neospora caninum* cumple la fase de reproducción asexual, pudiendo desarrollar la enfermedad.

Los perros y coyotes, actúan como hospedadores definitivos de la Neosporosis, liberando ooquistes en la materia fecal que contaminan los pastos; los bovinos, actúan como hospedadores intermediarios donde el parásito se multiplica en diferentes células y es capaz de atravesar la placenta.

La Neosporosis, genera en todos los continentes pérdidas económicas directas e indirectas, asociadas a: la asesoría veterinaria para establecer un diagnóstico, la repetición de la inseminación o cruce, aumento del tiempo de lactancia, pérdidas de producción láctea y los costos de reemplazo en los casos de eliminación de las vacas.

El diagnóstico de aborto por Neosporosis es complejo por el numero de hospedadores que intervienen en el ciclo biológico del protozoario, ya que la serología positiva sólo es indicativa de exposición a *Neospora caninum*. Se han

desarrollado una serie de técnicas diagnósticas, siendo las más utilizadas las serológicas que incluyen ELISA e IFI.

En El Salvador, la enfermedad ha sido demostrada en bovinos por Cuellar *et al.* (2004); además se demostró la presencia de quiste tisular en un feto abortado; sin embargo, resta mucho por hacer en los aspectos epidemiológicos de la enfermedad. Por tal motivo se diseñó el presente trabajo cuyos objetivos fueron: determinar la presencia de anticuerpos séricos contra *N. caninum* en caninos que habitan y transitan en tres ganaderías lecheras del Departamento de Sonsonate, evaluar si los mismos diferían entre poblaciones caninas rurales y urbano-marginales. Para ello se colectaron muestras serológicas para su posterior análisis a través de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). Otra variable en estudio fue establecer la influencia del sexo y edad en las poblaciones caninas de las explotaciones pecuarias.

Cabe mencionar que dichas ganaderías no fueron seleccionadas al azar, sino que se designaron por ser las tres explotaciones del Departamento de Sonsonate con mayor seropositividad (44%) del estudio realizado por Cuellar *et al.* (2004).

2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

2.1. DEFINICIÓN.

La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Neospora caninum*, que produce alteraciones neuromusculares en los perros y abortos o mortalidad neonatal en los bovinos (Dubey, 1999). Se ha detectado en gran cantidad de especies domésticas y salvajes, teniendo al perro y otros canidos como hospedadores definitivos y a bovinos, ovinos, caprinos, equinos, ciervos, búfalos de agua, camellos y caninos domésticos y salvajes como hospedadores intermediarios. Su distribución es cosmopolita.

En humanos no existen antecedentes de infección con este parásito (Petersen et al., 1999; Tranas et al., 1999 citado por Valenzuela, 2005). Sin embargo, existe la posibilidad que sea subdiagnosticado como toxoplasmosis (Bjerkås et al., 1994). Se considera que tiene un potencial zoonótico debido a que experimentalmente se ha logrado infectar a 2 monos rhesus, pero, aún no existe evidencia de infección en humanos (Dubey, 2003).

2.1.1. Neosporosis canina

Los estudios de seroprevalencia en perros han determinado que existe una mayor cantidad de animales con infección subclínica que animales desarrollando la enfermedad (Dubey, 2003). Los perros de cualquier edad pueden ser afectados, se ha reportado neosporosis clínica en perros desde los 2 primeros días de vida (Barber *et al.*, 1996), hasta los 15 años de edad (Dubey *et al.*, 1988). En estos animales predominan las manifestaciones clínicas de déficit neurológico y las alteraciones musculares.

Actualmente se sabe que el perro es el huésped definitivo de *N. caninum* (McAllister y col., 1998), éste excreta los ooquistes al medio ambiente, los que a su vez contaminan el alimento y el agua de bebida de los animales de producción.

2.1.2. Neosporosis en bovinos.

Se ha detectado infección con *N. caninum* en el ganado bovino alrededor de todo el mundo, tanto en animales de explotación lechera y de carne, se caracteriza por producir abortos espontáneos en el ganado.

La transmisión horizontal de dicha especie es por vía digestiva y la principal vía de transmisión es vertical; la mayoría de las terneras infectadas vía vertical nacen clínicamente sanas y sólo en un pequeño porcentaje, alrededor de 5%, ocurre muerte fetal (Williams et al., 2003; Maley et al., 2003; Piergili, 2003 citado por Campo, 2004).

2.2. HISTORIA.

Neospora caninum, fue identificada por primera vez en Noruega en perros jóvenes, padeciendo encefalomiелitis y miositis (Bjerkas et al. 1984). Seguidamente se aisló el agente en cultivo celular (Dubey et al., 1988). En 1993 se consiguió el primer aislamiento procedente de un feto bovino abortado (Conrad et al., 1993). Posteriormente se logró la reproducción de la muerte fetal en vacas gestantes inoculadas experimentalmente (Barr et al. Citado por Cornejo. 2002).

El parásito fue relacionado con *Toxoplasma gondii*, donde la transmisión transplacentaria ocurre solamente durante la fase aguda de la infección primaria de la hembra preñada; en los animales infectados con *Neospora caninum*, este proceso puede ocurrir repetidamente en el mismo animal. (Gottstein, 2002).

El descubrimiento del perro como el hospedador definitivo de *N. caninum* (McAllister et al., 1998), puso de manifiesto la posibilidad de transmisión horizontal de la infección. Actualmente, esta enfermedad parasitaria es considerada una de las causas más frecuentes de fallo reproductivo en bovinos de las principales zonas productoras bovinas del mundo (Dubey 1999a, b, 2003).

A este género también pertenece la especie *Neospora hughesi*, encontrada en caballos y que presenta diferencias moleculares que lo distinguen del *N. caninum* (Marsh *et al.*, 1998).

Por otro lado, más recientemente se ha considerado al *N. caninum* como agente primario, causante de enfermedad neuromuscular en perros jóvenes, por este motivo se han incentivado las investigaciones en los caninos. Al igual que en los bovinos, la infección ha sido reportada en perros de varios países, sin embargo los casos de enfermedad clínica aún son escasos. Los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento demuestran que en los perros presentan prevalencias variadas dado que los perros caseros o los de zonas urbanas poseen tasas de infección menor que los animales que viven en establos lecheros y que además dicha tasa aumenta cuando estos proceden de establos con problemas de abortos (Basso *et al.*, 1999).

2.3. MORFOLOGIA

N. caninum, pertenece al phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina, familia Sarcocystidae y género *Neospora* (Dubey, 1999a, b, 2003).

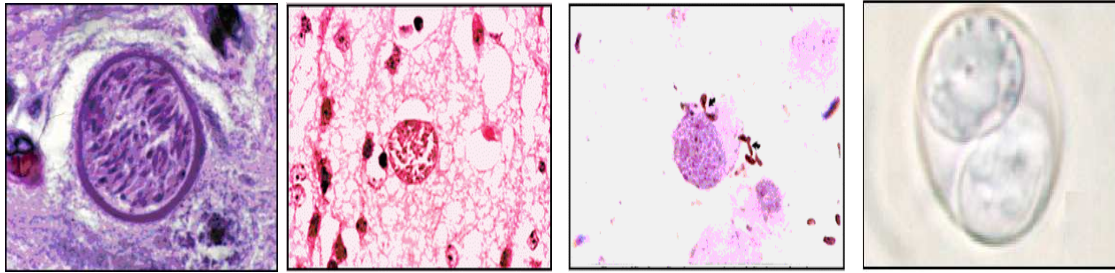
La ubicación taxonómica de *N. caninum* es aún motivo de debate. Inicialmente se la relacionó con tres especies de importancia veterinaria y de salud pública: *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi* y *Hammondia heydorni*.

Se han descrito tres estadios biológicos del *Neospora caninum*: los ooquistes, los taquizoítos y los quistes tisulares que contienen los bradizoítos. Los ooquistes son de forma esférica o subesférica y miden de 10 - 11 μm de diámetro (Dubey, 1999), son eliminados con las heces del perro, luego esporulan en el medio ambiente. Los ooquistes esporulados contienen 2 esporoquistes, cada uno con 4 esporozoítos y presentan las paredes más gruesas en comparación con los ooquistes de *T. gondii* (Lindsay *et al.*, 1999).

Los quistes tisulares se encuentran afectando el tejido nervioso de los perros y fetos abortados principalmente. Son de forma redondeada u oval, pueden llegar a medir hasta 110 μm de longitud y poseen una pared cuyo grosor varía entre 1 - 4 μm (Speer *et al.*, 1999 citado por Lozada, 2004). Se han encontrado en fetos de bovino quistes tisulares más pequeños que probablemente representen etapas tempranas de desarrollo (Barr *et al.*, 1997).

Los taquizoítos son de forma ovoide o de luna. Pueden llegar a medir entre 3-7x1-5 μm dependiendo de la etapa de división, puesto que lo hacen por endodiogenia en dos zoítos, pueden encontrarse aislados, en pares o grupos de cuatro a más (Dubey y Lappin, 2002). Los taquizoítos también se caracterizan por que tienen 1 núcleo (en ocasiones 2), un nucléolo, una membrana externa o plasmalema que tiene 3 capas (una externa y una interna que es doble), aparato de Golgi, una mitocondria, un retículo endoplasmático rugoso y liso. Además, posee un complejo apical que parece funcionar como un medio de adherencia o penetración hacia las células hospedadoras (Barr *et al.*, 1997).

FIGURA 1. DIFERENTES ESTADIOS DE *Neospora caninum*.



QUISTE TISULAR

BRADIZOITO

TAQUIZOITO

OOQUISTE

FUENTE: Animal Parasitology

FUENTE: Monografias.com

FUENTE: Monografias.com

FUENTE: Veterinary Parasitology

La diferencia más notable entre los tachizoítos de *T. gondii* y de *N. caninum* es la apariencia de las roptrias, que son organelas para la interacción metabólica y forma parte del complejo apical (Dubey y Lindsay, 1996). En el caso de *T. gondii* asemejan a un panal o a laberintos mientras que en *N. caninum* parecen ser más electrodensos y usualmente son más numerosas (Dubey et al., 2000). Los tachizoítos se localizan dentro de células hospederas en carnívoros infectados, principalmente se encuentran en células del tejido muscular esquelético, de la capa muscular del esófago y del corazón (Barber, *et al.*, 1996), en macrófagos, células polimorfonucleares del líquido raquídeo y en células neuronales (Dubey y Lappin, 2000). Dichas células pueden contener pocos o muchos tachizoítos y estos pueden estar o no dentro de vacuolas parasitófagas (Barr *et al.*, 1997).

Los bradizoítos son de 6-8 x 1-1.8 μm y son morfológicamente similares a los tachizoítos pero contienen menor número de roptrias (Dubey y Lindsay, 1996). Se han demostrado diferencias no sólo biológicas, inmunológicas, y morfológicas sino también moleculares entre la Toxoplasmosis y la Neosporosis (Dubey et al., 2002).

2.3.1. TAXONOMÍA

TABLA 1. TAXONOMIA DE *Neospora caninum*.

CLASIFICACIÓN	NOMBRE	CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS
Phylum	Apicomplexa	Formas Invasivas con complejo apical.
Clase	Sporozoea	Locomoción de formas invasivas mediante movimientos de flexión, ondulación y deslizamiento.
Subclase	Coccidia	El ciclo biológico incluye merogonia, gametogonia y esporogonia.
Orden	Eucoccidia	La merogonia tiene lugar en hospedadores vertebrados.
Suborden	Eimeriina	Existe desarrollo independiente de gametos masculinos (microgametos) y femeninos (macrogametos).
Familia	Sarcocystidae	Parásitos heteroxenos y formadores de quistes en el hospedador intermediario (diferentes especies de herbívoros). El hospedador definitivo (diferentes especies de carnívoros) elimina ooquistes en las heces.

FUENTE: Moore, 2006.

2.4. COMPOSICIÓN PROTEICA Y ANTIGÉNICA

Proteínas de 17-18 y 30-45 kDa han sido localizadas en la superficie del taquizoíto (Björkman et al., 1994). Björkman y Hemphill (1998) caracterizaron antígenos inmunodominantes de 18, 30, 32 y 41 kDa. Schares et al. (1999) identificaron tres antígenos de superficie de 19, 28 y 40 kDa que concordarían con los anteriormente descritos. La proteína NcSRS2, de 43 kDa fue la primera proteína clonada de *N. caninum* (Hemphill et al., 1996; Hemphill y Gottstein, 1996; Hemphill et al., 1997b). Esta proteína de superficie se expresa de forma compartida tanto en taquizoítos como bradizoítos (Fuchs et al., 1998), y está considerada como uno de los antígenos inmunodominantes. A continuación, Hemphill et al. (1997a) caracterizaron la glicoproteína SAG1 de 36 kDa localizada tanto en la superficie del parásito como en el interior de los gránulos densos. Esta proteína se expresa únicamente en la fase de taquizoíto (Fuchs et al., 1998). Bjerkas et al., (1994) identificaron dos proteínas inmunodominantes de 29 y 30 kDa localizadas en los gránulos densos. Lally et al. (1996) clonaron dos proteínas de gránulos densos de taquizoítos (NcGRA6 y NcGRA7 de 37 y 33 kDa, respectivamente). La proteína NcGRA7 se expresa tanto en el taquizoíto como en el bradizoíto (Fuchs et al., 1998). Otras proteínas de gránulos densos son las de 29 y 67 kDa, denominadas NcNTPasa-I (Asai et al., 1998) y NcGRA2 (Ellis et al., 2000). Considerada como inmunodominante, sólo se ha identificado una proteína de 17 kDa de las roptrias (Barta et al., 1992). Asimismo, se han caracterizado tres proteínas de micronemas, NcMIC3, NcMIC2 y NcMIC1 de 38, 95 y 60 kDa, respectivamente (Lovett et al., 2000; Sonda et al., 2000; Keller et al., 2002). NcMIC3 ha sido identificada como uno de los antígenos inmunodominantes de *N. caninum* (Sonda et al., 2000). La única enzima clonada de *Neospora* es una serinproteasa de 65 kDa (Louie et al., 1997, 2002) localizada en los micronemas del taquizoíto y denominada NcSUB1.

Fuente: Moore DP, 2006, Actualización en neosporosis bovina.

2.5. MEDIO AMBIENTE

Los ooquistes son la fase biológica del *N. caninum* directamente influenciada por medio ambiente. Estos salen con las heces de los perros y esporulan en el medio ambiente 24 horas después de haber sido eliminados (Lindsay *et al.*, 1999), en este momento presentan dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoítos (Dubey, 1999). Los ooquistes en las heces del perro contaminan los campos de pastoreo, la comida almacenada y el agua que consumen los bovinos, en este momento la transmisión de la infección vía oral dependerá de la viabilidad de los ooquistes en el medio ambiente.

En las otras etapas del parásito la influencia del medio ambiente es indirecta, a través del efecto que produce en los hospederos, ya sea intermediario o definitivo, es decir que en épocas de sequía, excesivo frío, falta de alimento u otros factores estresantes incrementarían la presentación de infecciones y casos clínicos.

2.6. CICLO DE VIDA

En la actualidad, no se conoce completamente las fases del ciclo biológico de *Neospora caninum*. McAllister y *col.* en 1998 demuestran experimentalmente que el perro es el hospedero definitivo del *N. caninum*, al comprobar la eliminación de ooquistes no-esporulados en las heces de perros que fueron alimentados con quistes tisulares de *N. caninum* que se encontraban en tejidos de ratón.

Este tipo de transmisión horizontal, ocurriría naturalmente, de manera que los perros se infectarían vía oral con quistes titulares de *N. caninum*, que se encuentran en placentas y en fetos abortados de bovinos (Dubey, 2003) o de otras especies que funcionan como hospederos intermediarios. Sin embargo, esta teoría solamente se ha comprobado experimentalmente (Gondim *et al.*, 2002). En este sentido, la infección es posible en perros cuando son alimentados con placentas seropositivas a *N. caninum*, sin presentarse eliminación de ooquistes en las heces (Bergeron *et al.*, 2001); pero cuando son alimentados con fetos

infectados naturalmente no presentaban infección (Bergeron *et al.*, 2001b). El descubrimiento que una gran cantidad de especies puede ser afectado por el *N. caninum*, evidencia que el rango de hospederos intermediarios es amplio, pero su rol en epidemiología del parásito es aún desconocida.

En los perros, luego de la transmisión horizontal, se produce la fase de reproducción sexual, con la eliminación de ooquistes no esporulados en las heces, 8-14 días post-infección (McAllister *et al.*, 1998), y por un período patente variable. Experimentalmente, el número promedio de ooquistes eliminados en las heces, cuando los perros son alimentados con tejidos de becerro o de ratón contaminados con quistes tisulares de *N. caninum* fue de 160 700 ó de 5 400 respectivamente (Gondim *et al.*, 2002).

La reproducción asexual se produce en el hospedero intermediario, los bovinos principalmente, luego de ingerir los ooquistes esporulados en el medio ambiente. Sólo son necesarios 300 ooquistes esporulados para infectar a una ternera y que esta sea capaz de inducir eliminación de ooquistes en otros perros cuando son alimentados con sus tejidos (Gondim *et al.*, 2002).

Los ooquistes en el tracto intestinal liberan los esporozoítos que penetran las células entéricas para transformarse en taquizoítos (Lindsay *et al.*, 1999). Estos taquizoítos dentro de la célula hospedadora se dividen por endodiogenia, multiplicándose y rompiéndola, para luego diseminarse hacia otras células del cuerpo y volver a repetir el mismo mecanismo (Lindsay *et al.*, 1999). Los taquizoítos pueden seguir su etapa de división o diferenciarse en bradizoítos que formarán los quistes tisulares.

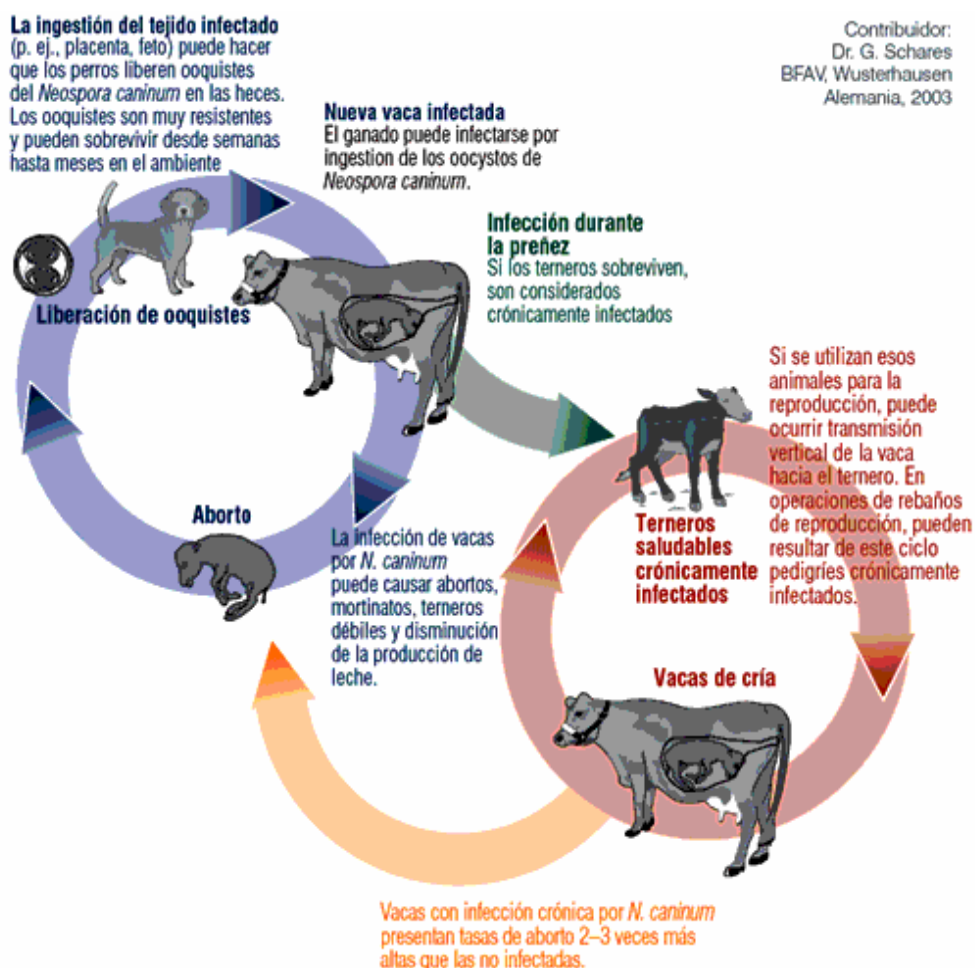
Tanto los taquizoítos y como los bradizoítos principalmente se van localizar en el feto, la placenta y el tejido nervioso de la madre; sin embargo los taquizoítos muestran mayor tropismo hacia las células del sistema nerviosos central (SNC), células musculares de tipo esquelético y cardíaco, células endoteliales y a la placenta (Barber *et al.*, 1996; Dubey y Lindsay, 1996). En bovinos adultos, las infecciones van ha ser inaparentes hasta el momento del aborto. En los fetos

abortados, los órganos más afectados son SNC, corazón, músculo esquelético y el hígado (Pérez *et al.*, 1999).

La transmisión del bovino al perro cierra el ciclo biológico, y se realiza a través de la ingestión de placentas contaminadas de partos normales, fetos abortados y carne cruda de bovinos que contienen taquizoítos y bradizoítos de *N. caninum*.

Existe además la transmisión vertical, se produce en el hospedero intermediario sea herbívoro o carnívoro y se presenta frecuentemente en forma natural en los bovinos y los perros. En las vacas, es la ruta principal de la infección y la forma en que permanece dentro de los rebaños lecheros. Se calcula que el 80% de vacas seropositivas pueden infectar a sus crías (Ortega *et al.*, 2001, citado por Cornejo, 2002) y por ejemplo, en Canadá, se estima que la transmisión sucede en el 44.4 % de los casos de neosporosis bovina y que aumenta en los rebaños con mayor cantidad de animales seropositivos pudiendo llegar hasta 85.7 % de infección (Bergeron *et al.*, 2000).

Figura 2. Ciclo de vida de *Neospora caninum*.



2.7. TRANSMISIÓN.

Los perros se transforman en hospedadores definitivos cuando ingieren tejidos con quistes de *N. Caninum*, diseminando luego ooquistes a través de las heces. McAllister et al (1998) demostraron experimentalmente que solo unos pocos quistes de *N. caninum* eran eliminados con las heces a partir del día 8 siguiente a la infección, siendo excretados irregularmente por un corto período de tiempo. Sin embargo nada era conocido con respecto a la presencia de ooquistes en heces de perros naturalmente infectados hasta que Basso et al (2001) encontraron ooquistes de *N. caninum* en heces de perros naturalmente infectados.

Los hospedadores susceptibles se infectan ingiriendo forraje y agua contaminada con heces que contienen ooquistes de *N. caninum*.

Seguidamente a la ingestión los esporozoítos son liberados en el tracto intestinal. Estos se dividen rápidamente causando daño tisular y diseminando la infección a otros tejidos del hospedador (Dubey and Lindsay, 1996). Los taquizoítos penetran en las células neurales transformándose en bradizoítos y en quistes tisulares.

Los quistes se encuentran solamente en el cerebro, médula espinal y retina (Lindsay et al., 1989). Los bradizoítos y quistes tisulares son resistentes a las soluciones ácidas de pepsina, indicando que los carnívoros juegan un importante rol en el ciclo del parásito. De tal manera que el rol epidemiológico de los carnívoros de vida silvestre, como los zorros, a adquirido una creciente importancia. Buxton *et al.* (1997), detectaron anticuerpos contra *Neospora caninum* en muestras de suero provenientes de zorros de Bélgica. Lindsay et al. (1996) encontraron anticuerpos contra *Neospora caninum* en sueros de coyotes provenientes de Texas.

2.7.1. TRANSMISIÓN VERTICAL.

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.

Catorce (93%) de los 15 descendientes de 10 vacas seropositivas fueron seropositivas. La transmisión vertical fue también demostrada. Davison, *et al.* (1999) estudiaron la transmisión de *Neospora caninum* en un rodeo lechero con historia de abortos asociada con el protozoario, encontrando que la probabilidad de transmisión vertical fue muy alta; 95% de las vacas seropositivas produjeron terneros que eran seropositivos antes del consumo de calostro.

Wouda *et al.* (1998) determinaron la transmisión vertical en 4 rodeos lecheros que habían tenido abortos debidos a *N. caninum*.

Los anticuerpos precalostrales contra *N. caninum* fueron demostrados en el 68% de los terneros F1 y en el 82% de los F2 provenientes de vacas que habían abortado.

2.7.2 TRANSMISIÓN HORIZONTAL

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. Además, estudios epidemiológicos y observaciones de campo están generando cada vez más evidencia sobre las infecciones postnatales de bovinos con *N. caninum*. Por otra parte una falta de asociación en la seropositividad entre madre e hija ha sido claramente demostrada en rodeos con abortos epidémicos (Thurmond *et al.*, 1997, Citado por Fort, 2001).

Seguidamente, en varios estudios la asociación entre la presencia de forraje contaminado con ooquistes provenientes de material fecal de perros y tormentas de abortos han sido identificada. McAllister et al (2000) reportan un brote de neosporosis en un rodeo de vacas, indicando que la epidemia de abortos y nacimientos prematuros resultó luego de una posible exposición con forraje contaminado con ooquistes. La curva de incidencia para este brote tuvo figuras que son consistentes con aquellas que siguen a un punto de exposición inicial.

La explicación de acuerdo a los investigadores tiene que ser que la epidemia de las explotaciones ganaderas está asociada a una reciente exposición de forraje contaminado con ooquistes provenientes de materia fecal de perro.

2.8. PATOGENIA.

El cuadro clínico de la neosporosis en los bovinos y caninos se presenta debido a la transmisión transplacentaria. Sin embargo, se ha conseguido la infección experimentalmente sin presentarse signos a través de las vías intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, calostrual y oral (Pérez *et al.*, 1999). En perros la transmisión congénita ha sido demostrada experimentalmente pero sin desarrollo de la enfermedad (Cole *et al.*, 1995).

La infección transplacentaria conlleva a la infección del feto con taquizoítos, que se encontraban en período de latencia en la madre gestante en forma de bradizoítos (Pérez *et al.*, 1999; Dubey y Lappin, 2000). Esta teoría aún no está comprobada y sólo un estudio ha encontrado la presencia de quistes tisulares viables de *N. caninum*, en el cerebro de una vaca que abortó (Sawada *et al.*, 2000) y además tampoco se sabe cuanto tiempo estos quistes pueden permanecer viables, aunque se cree que es por muchos años (Pérez *et al.*, 1999).

Los taquizoítos pueden invadir células de muchos tejidos, en forma experimental, penetran la célula hospedadora a través de proteoglicanos de superficie (Naguleswaran *et al.*, 2002), en menos de 5 minutos y se sitúan en el citoplasma dentro de una vacuola parasitófaga (Pérez *et al.*, 1999). Luego, comienza la multiplicación por endodiogenia, pudiendo albergar una célula hasta

100 parásitos. Esta invasión no es homogénea y algunas células presentan un índice elevado de parasitación mientras que otras un índice bajo, aún siendo sometidas a las mismas condiciones (Pérez *et al.*, 1999).

La multiplicación activa provoca la ruptura de la célula hospedadora y necrosis del tejido invadido. La respuesta del organismo se presenta como una infiltración no purulenta aguda, que rodea el área de necrosis; si el proceso perdura en el tiempo, puede haber proliferación de tejido conectivo en la zona, pero en ocasiones la lesión en el tejido nervioso puede verse rodeada de una pared gruesa, sin que exista ningún otro tipo de reacción del hospedero frente a los parásitos (Pérez *et al.*, 1999). Dependiendo del tejido dañado (principalmente nervioso, muscular, del feto o de la placenta) se presentarán los signos clínicos.

La enfermedad neuromuscular observada en cachorros y terneros se debe a las lesiones en el tejido nervioso y muscular. En el SNC, el parásito invade neuronas y astrocitos, además afecta los nervios craneales y espinales provocando trastornos neuromusculares e interrupción de la transmisión del impulso nervioso (Pérez *et al.*, 1999). En perros con signos clínicos, los parásitos están distribuidos en el SNC en su mayoría afectando el cerebro. Específicamente los taquizoítos son muy frecuentes en musculatura estriada esquelética, corazón y esófago (Barber *et al.*, 1996). Los focos de necrosis en otros órganos, se deben a la diseminación y multiplicación activa de los taquizoítos en una parasitemia aguda (Barber *et al.*, 1996).

En el aborto bovino, la elevación de anticuerpos contra *Neospora caninum* a los 4-5 meses antes del parto y la inmunosupresión que se produce durante la gestación sugieren la idea de la infección transplacentaria debido a la reactivación del parásito (Dubey, 2003); pero se conoce poco sobre este mecanismo.

Los quistes pueden aparecer en el feto a los 32 días de la infección de la madre (Pérez *et al.*, 1999). El aborto se puede presentar entre 3-9 meses de gestación y si la muerte del feto se produce antes de esta fecha se puede producir una reabsorción fetal (Pereira-Bueno *et al.*, 1999, Citado por Cornejo, 2002). En

ganado lechero, los brotes de abortos por *N. caninum* pueden ser inducidos por factores que estimulan las infecciones crónicas más que debido a reinfecciones, como son los relacionados con la alimentación pobre, micotoxinas y el estrés (Wouda, 1998).

En perros, el aborto ha ocurrido en forma experimental, pero no ha sido reportado naturalmente (Barr *et al.*, 1997). En ésta especie, también se piensa en la reactivación del *N. caninum* por factores inmunosupresores (Dubey y Lappin, 2000). En ese sentido, se sabe que la administración prolongada de corticosteroides en animales infectados con *N. caninum* exacerba la enfermedad (Pérez *et al.*, 1999), en perros esto ha sido más evidente con el tratamientos prolongado con glucocorticoides. Además, la administración de vacunas de virus vivo modificado, enfermedades inmunosupresoras o concomitantes pueden hacer que brote la enfermedad (Dubey y Lappin, 2000; La Perle *et al.*, 2001).

En cuanto a la respuesta del organismo, la infección estimula la respuesta humoral y celular. En el caso de las vacas, estas dos líneas son detectables durante la infección, tanto en hembras preñadas como vacías (Innes *et al.*, 2001). Niveles de anticuerpos elevados al momento del parto o entre el tercero y octavo mes de gestación están asociados con la probabilidad de infección congénita (Schaes *et al.*, 1999). La infección a la mitad de la gestación trae consigo nacimiento de terneros con títulos de anticuerpos altos (Innes *et al.*, 2001). En forma experimental, la infección en vacas aproximadamente 6 semanas antes de la gestación protege al feto contra una posible reinfección en la mitad de la gestación, los terneros nacerán negativos a *N. caninum* tanto serológicamente como antigénicamente (Innes *et al.*, 2001). La respuesta celular comprende células T, que producen citoquinas y junto al gamma interferón han demostrado que inhiben la multiplicación de *N. caninum* en cultivos celulares (Innes *et al.*, 2000).

2.9. SIGNOS CLÍNICOS.

2.9.1. Signos clínicos en los perros.

Los perros de cualquier edad pueden ser afectados, se ha reportado neosporosis clínica en perros desde los 2 primeros días de vida (Barber *et al.*, 1996), hasta los 15 años de edad (Dubey *et al.*, 1988). La raza y el sexo no parecen influenciar en la presentación de neosporosis canina, sin embargo se menciona una frecuencia notable de perros de raza pura, en especial pointers alemanes de pelo corto, labradores, boxer, labradores dorados, basset hounds y greyhounds (Dubey y Lappin, 2000).

En estos animales predominan las manifestaciones clínicas de déficit neurológico y las alteraciones musculares. Los signos neurológicos dependen de la parte del sistema nervioso parasitado (Jackson *et al.*, 1995; Baber *et al.*, 1996). Otros signos inespecíficos hacen comprender afección hepática, pulmonar o miocárdica (Baber *et al.*, 1996), sin embargo cualquier tejido puede ser afectado.

Las infecciones más graves se observan frecuentemente en cachorros infectados congénitamente y generalmente son menores de 6 meses. Los miembros pélvicos se afectan con mayor gravedad que los torácicos. Los animales presentan parálisis ascendente de los miembros con atrofia y rigidez muscular gradual, que progresa hasta la contractura rígida de los músculos del miembro afectado e incluso no pueden ser flexionados con los pacientes anestesiados (Barr *et al.*, 1997; Dubey y Lappin, 2000).

Debido a la formación de cicatrices en los músculos por daño de neurona motora baja y miositis resulta una artrogriposis. En ciertos cachorros puede desarrollarse deformaciones articulares, rodilla curvada, nistagmo, debilidad cervical, disfagia, falla cardíaca y terminar en la muerte (Barber, 1998; Dubey y Lappin, 2000). Los perros no presentan manifestaciones de afección intracraneal y conservan actitud de alerta (Barr *et al.*, 1997; Dubey y Lappin, 2000). Es posible, que la enfermedad en algunos pacientes detenga su evolución y pueden

sobrevivir durante meses con alimentación manual y cuidados, pero permanecen parálíticos con las complicaciones concurrentes (Dubey y Lappin, 2000).

Los caninos adultos se afectan con menor frecuencia. Ellos suelen tener signos de afección multifocal del Sistema Nervioso Central o polimiositis, como temblor de la cabeza, ataxia de los miembros y depresión; las manifestaciones menos comunes que resultan de la diseminación son: miocarditis, dermatitis piogranulomatosa y neumonía (Dubey y Lappin, 2000).

Por otro lado, la dermatitis ha sido reportada asociada a tratamiento prolongado con glucocorticoides (La Perle *et al.*, 2001).

Estudios experimentales sugieren que *N. caninum* puede ocasionar muerte fetal temprana, momificación, resorción y nacimiento de cachorros débiles. La infección fetal puede producirse en cualquier momento de la gestación, pero las consecuencias para el feto son más graves al inicio (Dubey y Lappin, 2000). Aunque una característica principal de la enfermedad en el ganado es el aborto, en perros no hay informaciones de ésta manifestación en forma natural. La muerte se puede presentar en perros de cualquier edad.

2.9.2. Signos clínicos en los bovinos.

La enfermedad en los bovinos adultos se manifiesta con el aborto o en su defecto con el nacimiento de terneros que padecen de alteraciones neuromusculares. Después de producido el aborto no hay retención de placenta, las vacas entran en celo en forma normal y la fertilidad no se ve afectada (Anderson *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 1999).

Los abortos debido a *N. caninum* pueden producirse en cualquier época del año y presentarse de manera esporádica, endémica o en forma de brotes epidémicos (Pérez *et al.*, 1999), puede afectar tanto a vaquillas como a vacas. Aun se desconoce la relación entre la edad de los animales y la receptividad a la infección, pero se reporta que no existe diferencia entre el número de partos y el riesgo de sufrir abortos (Obendorf *et al.*, 1994).

Generalmente, el aborto se produce entre el 3° y el 9° mes de la gestación, pero es más frecuente entre los 4-6 meses (Lindsay *et al.*, 1996). No se detectan signos clínicos previos al aborto. Los fetos generalmente se presentan autolíticos y en ocasiones con grados variables de momificación (Bidfel *et al.*, 1994). No se presentan lesiones características a simple vista, pero algunas veces se pueden apreciar zonas blanquecinas correspondientes a zonas de necrosis e inflamación; en los fetos autolíticos las lesiones son inaparentes. En la placenta también se pueden apreciar zonas blanquecinas de lesiones. De producirse la momificación del feto, puede ser abortado o bien retenido hasta el final de la gestación (Pérez *et al.*, 1999). Solo entre el 5-6% de las vacas de un rebaño afectado con abortos debido *N. caninum* probablemente aborte nuevamente, también se reporta que el 43.8% de las vacas que abortaron por primera vez, lo volvieron hacer, pero no se definió si se debió a una reactivación de los quistes o si se debió a una reinfección (Obendorf *et al.*, 1995).

Los terneros que nacen infectados y vivos pueden presentar la enfermedad nerviosa entre los 4-5 días o hasta 2 semanas luego del parto. Estos animales han presentado signos clínicos variables, que van desde incoordinación ligera hasta parálisis completa, debilidad y dificultad para levantarse. Los miembros anteriores y/o posteriores pueden estar flexionados o hiperextendidos. El examen neurológico revela ataxia, disminución del reflejo patelar y pérdida de la coordinación. En ocasiones hay exoftalmia, posición asimétrica de los ojos y otras deformaciones asociadas con la lesión en las células nerviosas embrionarias. La gran variabilidad del cuadro clínico observado en los animales con neosporosis congénita está relacionada probablemente con la edad y el desarrollo del sistema inmune del feto en el momento de la infección y con la distribución de las lesiones en el SNC (Pérez *et al.*, 1999).

La presencia de signos clínicos de la neosporosis bovina, se hace aun más inespecífica debido las distintas resoluciones que puede tener la infección. En casos en que la muerte fetal se produce antes de los 3 meses probablemente se acompañe de reabsorción (Pérez *et al.*, 1999). La infección congénita con la producción de terneros infectados pero clínicamente sanos parece ser bastante

frecuente. Estos animales son los encargados de mantener la infección dentro de los rebaños (Pérez *et al.*, 1999).

2.10. LESIONES.

2.10.1 Lesiones de la enfermedad neuromuscular del perro.

Las lesiones en un animal se presentan frecuentemente a nivel de tejido muscular estriado y nervioso y en ocasiones en la piel. En tejido muscular, especialmente del diafragma, se aprecian estrías transversales de necrosis, fibrosis y mineralización de músculos. También puede haber hepatomegalia, neumonía o malacia del tejido cerebral o de la médula espinal (Barber *et al.*, 1996).

Microscópicamente, en el cerebro se aprecia encefalomiелitis no supurativa, poliradiculitis, gangliositis. La encefalomiелitis va acompañada de degeneración axonal y formación de nódulos gliales en el cerebro. En los perros jóvenes es frecuente la radiculoneuritis. El tejido muscular puede presentar necrosis focal con miositis y/o miofibrosis o con inflamación generalizada de todos los músculos esqueléticos, corazón y esófago. En piel se reporta piodermatitis grave. Es común encontrar taquizoítos en tejido pulmonar, hígado, glándulas suprarrenales, tiroides y útero pero sin que tengan importancia clínica. Los quistes se pueden encontrar en tejido nervioso central o periférico mientras que los taquizoítos en todos los órganos (Barber *et al.*, 1996).

La piodermatitis vista en perros adultos se caracteriza por nodulaciones y ulceraciones en la piel de la cara y parte interna de los miembros posteriores. La impronta de estas lesiones evidencia eosinofilia, neutrofilia y es común observar taquizoítos (Barber, 1998; Fritz, 1997).

2.10.2. Lesiones en los fetos abortados y en terneros infectados.

Los fetos abortados aparecen frecuentemente momificados y en ocasiones autolíticos. Macroscópicamente se aprecian lesiones a nivel de los cotiledones de la placenta, que presentan edema y focos blanquecinos correspondientes a zonas de necrosis a veces calcificadas, acompañado microscópicamente de placentitis no supurativa, donde en algunas ocasiones es posible observar taquizoítos dentro de los trofoblastos (Pérez *et al.*, 1999).

Las lesiones macroscópicas en los fetos abortados son raras, pero lo más frecuente es observar áreas blanquecinas en la musculatura estriada que al corte se profundizan, congestión hepática, corazón aumentado de tamaño y zonas de malacia a nivel del encéfalo (Pérez *et al.*, 1999).

Las alteraciones microscópicas se pueden apreciar en varios tejidos, pero principalmente en SNC, músculo estriado incluyendo el corazón y en el hígado. Otros órganos menos afectados son los riñones, pulmón, páncreas y glándulas adrenales. A nivel del SNC, se aprecia una encefalomiелitis multifocal no supurativa con zonas de malacia, proliferación de microglías y astrocitos, a veces acompañados con hemorragias, mineralización y focos de meningitis (Schaes *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1999). En el corazón, se aprecia miocarditis focal o difusa no supurativa, acompañado de fibras musculares degeneradas o con necrosis e incluso calcificación. El músculo estriado se afecta con una polimiositis multifocal no supurativa. En el hígado, puede presentarse una hepatitis no supurativa difusa, a veces con zonas de necrosis focales o difusas, puede existir congestión pasiva crónica, con venas centrolobulillares dilatadas y sinusoides degenerados (Agerholm y Barr, 1994; Anderson *et al.*, 1995, Citado por Cornejo, 2002). En los nódulos linfáticos es evidente la hiperplasia con folículos linfoides activos. En otros órganos afectados, el cuadro que se aprecia es similar, una inflamación con infiltrado celular que en su mayoría es mononuclear (Pérez *et al.*, 1999).

En ocasiones, puede observarse reacciones inflamatorias de tipo granulomatoso alrededor de algunos quistes degenerados y bradizoítos, lo que

sugiere que se produjo la rotura de dichos quistes que inducen este tipo reacción inflamatoria. La observación de los parásitos en los fetos abortados es difícil, por diversos factores, y solo es posible con técnicas de inmunohistoquímica (Dubey, 2003).

Los terneros infectados que logran nacer, presentan focos de malacia en SNC que pueden ser observados macroscópicamente. Las lesiones en tejido nervioso son similares a las observadas en los fetos abortados, con la excepción de que son más frecuentes en la médula espinal. También es apreciable la encefalomiелitis no purulenta, acompañada de zonas de necrosis, vacuolización de las neuronas, degeneración de los axones neuronales y focos de gliosis, estas lesiones son también vistas en nervios espinales. La observación de taquizoítos y quistes en las lesiones de estos animales es más frecuente (Pérez *et al.*, 1999).

2.11. EPIDEMIOLOGIA.

En una muy documentada revisión Dubey (2003), cita diferentes prevalencias en perros urbanos y rurales: en Japón 31 y 7 %; en Holanda 23,6 y 5,5 %, y en Argentina 48 y 22,2 %, respectivamente.

En Inglaterra, 50 % de cachorros nacidos de perras seropositivas (IFA > 1:50) mostraron seropositividad y 25 % de ellos desarrollaron cuadros compatibles con Neosporosis de transmisión vertical.

Tres perras produjeron sucesivas camadas infectadas, (éste fenómeno parece ser característica de la transmisión vertical, pues también ocurre en Toxocariasis).

Aún poco se conoce sobre el mecanismo de infección de los perros en la naturaleza. Los perros pueden excretar ooquistes en más de una oportunidad (Rojas, 2003).

En el país, la primera evidencia de la presencia de Neospora en bovinos se demuestra serologicamente por Cuellar en 2004 resultando con un 42.44% de

sueros positivos, utilizando la técnica de ELISA. Dubey (2003), cita prevalencias de 12,1 a 77 % en las vacas de algunos países de América, Europa y Australia.

2.11.1. Prevalencia y distribución geográfica.

La neosporosis bovina ha sido informada en África, América, Asia, Europa y Oceanía (Dubey, 2003). Los valores de seroprevalencia obtenidos varían de acuerdo al país, región, técnica diagnóstica, punto de corte, tamaño de muestra seleccionado, características del muestreo, tipo de ganado (para leche o para carne), explotaciones con o sin antecedentes de sufrir pérdidas reproductivas, siendo difícil su comparación. Por otro lado, los datos sobre la prevalencia de la neosporosis en bovinos para carne son muy escasos. En las Tablas 2 y 3 se muestran algunos trabajos de seroprevalencia en bovinos para carne y para leche de diferentes países. (Moore, 2006).

Tabla 2. Seroprevalencia individual de la infección por *N. caninum* en el ganado bovino de aptitud lechera.

PAÍS	Nº DE ANIMALES	PREVALENCIA (%)	TÉCNICA DIAGNÓSTICA	REFERENCIAS
Alemania	1357	6,8	ELISA	Weber et al., 2000
Argentina	1048	16,6	IFI	Moore et al., 2002
Bélgica	70	29	IFI	De Meerschman et al., 2000
	447	14	IFI	Gondim et al., 1999
	172	34,8	ELISA	Locatelli-Dittrich et al., 2001
Brasil	223	11,2	IFI	Corbellini et al., 2002
	2037	21,9	ELISA	Bergeron et al., 2000
	3412	7,0	ELISA	Cramer et al., 2002
Canadá	3702	12,1	ELISA	Hobson et al., 2002
	3162	10,5	ELISA	Hobson et al., 2002
Corea	492	23	ELISA	Bae et al., 2000
Costa Rica	3002	39,7	ELISA	Romero et al., 2002
Dinamarca	1561	22,0	ELISA, IFI	Jensen et al., 1999
USA	1029	28,0	IFI	Dyer et al., 2000
España	889	30,6	ELISA	Mainar-Jaime et al. 1999
	1121	36,8	ELISA	Quintanilla-Gozalo et al., 1999
Francia	1170	11,1	ELISA	Pitel et al., 2001
	2141	17,0	ELISA	Pitel et al., 2001
Holanda	2430	39,4	ELISA	Dijkstra et al., 2001 ^a
Italia	5912	24,4	IFI	Magnino et al., 1999
Malasia	100	9	IFI	Cheah et al., 2001
Méjico	187	59,0	ELISA	García-Vazquez et al., 2002
Nueva Zelanda	880	7,6	IFI	Reichel, 1998
Paraguay	297	35,7	ELISA	Osawa et al., 2002
Polonia	45	15,6	ELISA	Cabaj et al., 2000
Portugal	119	49	ELISA	Thompson et al., 2001
Reino Unido	4295	17,0	ELISA	Davison et al., 1999d
República Checa	463	3,9	ELISA, IFI	Václavěk et al., 2003
Rusia	391	9,9	ELISA	Conraths et al., 2000
Tailandia	904	6,0	IFI	Suteeraparp et al., 1999
Taiwán	613	44,9	IFI	Ooi et al., 2000
Vietnam	200	5,5	ELISA	Huong et al., 1998

Técnicas diagnósticas: ELISA: análisis inmunoenzimático; IFI: inmunofluorescencia indirecta.

FUENTE: Moore, 2006

Tabla 3: Seroprevalencia de la infección por *N. caninum* en bovinos para carne.

PAÍS	Nº DE ANIMALES	PREVALENCIA (%)	TÉCNICA DIAGNÓSTICA	REFERENCIAS
Argentina	400	4,7	IFI	Moore et al., 2002
Bélgica	93	14	IFI	De Meerschman et al., 2000
Canadá	1806	9,0	ELISA	Waldner et al., 1999
Corea	438	4,1	IFI	Kim et al., 2002
EE.UU	2585	23	ELISA	Sanderson et al., 2000
	1009	12,9	DAT	Barling et al., 2000
España	1712	17,9	ELISA	Quintanilla-Gozalo et al., 1999
Francia	219	4,1	ELISA	Klein et al., 1997
Paraguay	582	26,6	ELISA	Osawa et al., 2000

Técnicas diagnósticas:

ELISA: análisis inmunoenzimático; IFI: inmunofluorescencia indirecta; DAT: inmunoaglutinación directa.

FUENTE: Moore, 2006

2.12. DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de la neosporosis canina y bovina requiere de un procedimiento de recolección de información, que empieza con los datos de la anamnesis, epidemiología y la observación de signos clínicos y lesiones, los cuales sugieren un diagnóstico presuntivo que debe ser confirmado por exámenes especializados. Los procedimientos rutinarios de laboratorio generalmente sólo demuestran anticuerpos séricos a *N. caninum*, éste resultado confirma de infección y se hace necesario para el diagnóstico definitivo demostrar la presencia del parásito en las lesiones (Dubey, 2003).

2.12.1. Diagnóstico de la Neosporosis canina.

En los caninos, el diagnóstico de la enfermedad requiere la observación de signos clínicos característicos, análisis serológico y determinación del parásito en las lesiones. A pesar de demostrar que el perro es capaz de eliminar ooquistes de *N. caninum* en las heces, el análisis coprológico no se utiliza como diagnóstico (Cornejo, 2002).

2.12.1.1. SEROLOGIA.

La serología ha sido usada frecuentemente como herramienta para desarrollar estudios epidemiológicos buscando la asociación entre *N. Caninum* y abortos en bovinos. La mayoría de los autores encontraron que existía una alta correlación entre ambas.

- TEST DE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

IFI fue el primer test aplicado a la detección de anticuerpos contra *N. Caninum* y ha sido ampliamente usada para el diagnóstico, siendo considerada la técnica estándar para comparación con otras (Dubey& Lindsay, 1996).

En la técnica de IFI (Barr & Anderson, 1995, Citado por Moore, 2006), se encuentran suspensiones de taquizoítos de *Neospora caninum* (5×10^6 ml⁻¹) son secadas al aire sobre portaobjetos y fijadas en acetona. Las muestras de suero son evaluadas comenzando con una dilución de 1:50. Después de la incubación y lavado un anticuerpo específico conjugado con isotiocianato de fluoresceína es agregado. Luego del último lavado los portaobjetos son examinados y solamente la presencia de fluorescencia periférica es considerada como específica.

- IMUNOBLOTTING (IB).

Este test es usualmente usado junto a otros, más que como una herramienta individual, siendo considerado un test esencial para la determinación de antígenos inmunodominantes (Atkinson et al., 2000, Citado por Moore, 2006). Como se dijo anteriormente, los animales infectados con *N. caninum* reconocen predominantemente antígenos con un peso molecular de 17, 29/30 y 37 Kda. En IB un resultado es considerado positivo cuando 2 ó 3 de 4 antígenos inmunodominantes están presentes (Bjerkas et al., 1994).

- PRUEBAS INMUNO-ENZIMÁTICAS (ELISA).

El ELISA ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la neosporosis. La facilidad para procesar un gran número de muestras, sin embargo no se comercializa dirigido a esta especie.

- PRUEBA DE AGLUTINACIÓN.

Un test de aglutinación en microplacas, usando taquizoítos como antígeno también es utilizado para el diagnóstico de Neosporosis. Este test es muy útil porque no requiere anticuerpos secundarios, conjugados, equipamiento para ELISA o microscopio para inmunofluorescencia.

2.12.1.2. MICROSCOPIA ÓPTICA.

La histopatología, es el método más corriente para diagnosticar la infestación por *Neospora caninum*, identificando al parásito en la zona lesionada (Moore, 2006).

2.12.1.3. INMUNOHISTOQUÍMICA.

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 (Moore, 2006).

2.12.1.4. MICROSCOPROSCOPIA.

A pesar de demostrar que el perro es capaz de eliminar ooquistes de *N. caninum* en las heces, el análisis coprológico no se utiliza como diagnóstico, por que los ooquistes son difícil distinguir por microscopia óptica con los de *T. gondii* y *Haemondia* (Dubey, 1999).

2.12.1.5. REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA. (PCR).

Las técnicas de PCR, son útiles para detectar el parásito en los tejidos de fetos abortados. Las ventajas de ésta técnica son su elevada especificidad y sensibilidad y la capacidad de amplificar pequeñas cantidades de ADN de *Neospora caninum* en una gran variedad de tejidos.

2.12.1.6. AISLAMIENTO.

El primer aislamiento de *Neospora caninum*, fue logrado a partir de material del sistema nervioso central obtenido de un perro infestado.

El aislamiento en cultivos celulares a partir de fetos es dificultoso debido a la severa autólisis de las células del hospedador, el bajo número de parásitos presentes y a la alta probabilidad de contaminación. (Basso, 2004).

2.12.2. DIAGNÓSTICO EN BOVINOS.

2.12.2.1. DIAGNÓSTICO DEL ABORTO BOVINO.

Es importante enviar el feto completo y el suero de la madre para el diagnóstico. La detección de la infección en la vaca abortada no confirma que el aborto haya sido causado por *N. caninum*, sin embargo este resultado sugiere bastante el diagnóstico (Dubey, 2003). Las pruebas de mayor valor confirmativo para el diagnóstico de neosporosis fetal son los exámenes de histopatología, inmunohistoquímica y detección de ácidos nucleico por PCR; pero también se pueden realizar pruebas serológicas de los fluidos fetales.

La demostración de *N. caninum* en los tejidos fetales lesionados con pruebas de inmunohistoquímica es la mejor evidencia de la etiología de aborto en la actualidad, sin embargo esta prueba no es muy sensible (Dubey, 2003).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es de alta sensibilidad y especificidad. Es de gran ayuda para el diagnóstico de fetos autolisados y muestras con fijación química (como muestras formolizadas y/o fijados en parafina) (Dubey, 2003). Las pruebas serológicas también son útiles para el diagnóstico del aborto debido a *N. caninum*, incluso si se encuentran autolisados. Se puede realizar pruebas de IFI y ELISA. Se puede usar el suero de sangre o cualquier fluido del cuerpo del feto, pero es el más indicado para el diagnóstico serológico es el fluido peritoneal (Dubey, 2003). La presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en el feto va depender de la edad del feto en el momento de la infección, el nivel de parasitemia y el periodo que transcurre desde la infección hasta la muerte fetal. Los resultados positivos establecen la infección con *N. caninum* y los resultados negativos no la descartan (Dubey, 2003). La inmunoglobulina detectada es la IgM específica y en ese sentido la prueba de IFI no ha presentado reacción cruzada con otros protozoos. Incluso títulos por debajo de 1:25 en la prueba de IFI, deben considerarse específicos para el *N. caninum* sobre todo en los fetos (Dubey, 2003).

En los terneros con o sin signos clínicos se recoge el suero con la finalidad de realizar el diagnóstico con pruebas serológicas y tal muestra debe ser tomada antes de que se ingiera el calostro (Dubey, 2003).

2.12.2.2. DIAGNÓSTICO EN BOVINOS ADULTOS.

Las pruebas serológicas son la mejor herramienta para el diagnóstico en bovinos adultos, estas incluyen la prueba de aglutinación de anticuerpos, la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), el ELISA indirecto y la prueba de Immunoblots que es útil para detectar anticuerpos específicos a *N. caninum* (Dubey, 2003).

La prueba de IFI tiene una sensibilidad de 98% y una especificidad de 99 % (Packham, *et al.*, 1998 Citado por Cornejo, 2002). Se ha diseñado una prueba de ELISA recientemente para distinguir las infecciones crónicas en el ganado y que podría ser usada para distinguir el aborto endémico y epidémico (Dubey, 2003).

TABLA 4. Aislamiento de *Neospora caninum*.

DENOMINACION	PAIS	ORIGEN	MUESTRA	REFERENCIA
NC-1	USA	CANINO	CEREBRO	Dubey et al., 1988a
NC-3	USA	CANINO	CEREBRO	Cuddon et al., 1992
BPA-3	USA	TERNERO	CEREBRO	Barr et al., 1993
BPA-4	USA	TERNERO	CEREBRO	Barr et al., 1993
NC-Liv	REINO UNIDO	CANINO	CEREBRO	Barber et al., 1993
BPA-1	USA	FETO	CEREBRO	Conrad et al., 1993
BPA-2	USA	FETO	CEREBRO	Conrad et al., 1993
JPA-1	JAPON	TERNERO	CEREBRO	Yamane et al., 1996
JPA-4	JAPON	TERNERO	CEREBRO	Yamane et al., 1996
JPA-5	JAPON	TERNERO	CEREBRO	Yamane et al., 1996
BT2	JAPON	TERNERO	CEREBRO	Yamane et al., 1996
NC-LivB1	REINO UNIDO	TERNERO	CEREBRO	Davison et al., 1999b
NC-PV1	ITALIA	TERNERO	CEREBRO	Magnino et al., 1999
NC-Beef	USA	TERNERO	CEREBRO	McAllister et al., 2000
KBA-1	COREA	TERNERO	CEREBRO	Kim et al., 2000
KBA-2	COREA	FETO	CEREBRO	Kim et al., 2000
NC-GER1	ALEMANIA	CANINO	CEREBRO	Peters et al., 2000
NC-Bahia	BRASIL	CANINO	CEREBRO	Gondim et al., 2001
NC-Porto1	PORTUGAL	FETO	CEREBRO	Canada et al., 2002
NC6-Argentina	ARGENTINA	CANINO	HECES	Basso et al., 2001 ^a
NC7-Japón	JAPON	OVEJA	CEREBRO	Koyama et al., 2001
NC-Nowra	AUSTRALIA	TERNERO	CEREBRO	Miller et al, 2002
NC-Illinois	USA	TERNERO	CEREBRO	Godim et al., 2002
BNC-PR1	BRASIL	TERNERO	CEREBRO	Locatelli-Dittrich et al., 2003

FUENTE: Moore, 2006

2.12.2.3. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

En Bovinos:

- DVB (Diarrea Viral Bovina).
- RIB (Rinotraqueitis Infecciosa Bovina).
- Brucelosis.
- Leptospirosis.
- PI3 (Parainfluenza 3).

En caninos:

- Toxoplasmosis.
- Sarcocystis. (Rojas, 2003).

2.13. TRATAMIENTO.

En caninos, al igual que en los bovinos debido a la ausencia de un tratamiento específico, se ha recomendado una terapéutica similar a la utilizada en los casos de toxoplasmosis (*T. gondii*), la cual consiste en el uso de Clindamicina oral en dosis de 12.5 a 18.5 mg/kg/pv. Suministrada dos veces por día durante un período de 2 a 4 semanas. También, resulta eficaz la combinación de piremetamina y sulfonamidas vía oral a dosis de 0.25 a 0.5 y 30 mg/kg/p.v. respectivamente, cada 12 horas por 4 semanas. (Cuellar *et al.*, 2002).

Han sido probados in-vitro fármacos contra taquizoítos en cultivo celular, donde se demuestra actividad de los inhibidores de la reductasa de dihidrofolato y las sulfonamidas, por separado o combinadas (Lindsay, *et al.*, 1996), además también tienen actividad los antibióticos ionóforos, tetraciclinas, macrólidos y las lincomicinas (Lindsay, *et al.*, 1994 citado por Cornejo, 2002).

Drogas como el toltrazuril y pronazuril para prevenir la infección vertical, están en experimentación.

2.14. PREVENCIÓN Y CONTROL.

En la actualidad no existe una conducta de control, prevención ni tratamiento específico para la enfermedad. Esto es principalmente debido a la poca información que se tiene del parásito, de su comportamiento en los huéspedes intermediarios, ni del efecto que tendría la presencia de los animales congénitamente infectados dentro de los hatos.

Las propuestas de control y prevención sobre la infección congénita han sido variadas, por ejemplo Lindsay *et al.* (1990), postularon el efecto benéfico del uso de anticoccidiales para inhibir el desarrollo de la *Neospora*, pero no pudieron definir realmente si su uso evitaba la infección o el aborto. También se ha propuesto la necesidad de implementar altas tasas de reemplazo o el empleo de transferencia de embriones con novillas no infectadas.

Las medidas orientadas al control y prevención de la infección postnatal se fundamentan en el conocimiento del ciclo de vida del parásito. Aquí juegan un papel importantísimo las poblaciones de caninos y probablemente de otros carnívoros como contaminantes de forrajes y de fuentes de agua a través de la materia fecal. Así mismo se debe limitar el acceso de los mismos al consumo de tejidos bovinos que puedan estar contaminados como son las placentas o los animales muertos en la finca. Es muy importante la identificación de animales seropositivos y congénitamente infectados para establecer normas de manejo dentro del hato como por ejemplo la cría individual que disminuyan el riesgo de contacto e infección entre terneras (Zambrano *et al.*, 2002?).

Vacunación contra *Neospora caninum* en animales seronegativos (5ml s.c. 56 y 77 días de gestación), para eliminar la transmisión transplacentaria en los bovinos y además reducir los abortos (Cuellar *et al.*, 2002).

Evitar el acceso a perros y otros carnívoros a las instalaciones destinadas al ganado, sobretodo a depósitos de alimentos y potreros (Cuellar *et al.*, 2002).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Generalidades.

3.1.1. Ubicación geográfica.

El estudio se desarrollo en Departamento de Sonsonate, dentro y alrededores de las tres ganaderías lecheras, ubicadas en la zona central y la zona costera de dicho departamento en los municipios de Caluco (L1), Acajutla (L2) y Sonzacate (L3), para poder identificarlas se les designo como; L1, L2 y L3 (Figura A1).

La fase de laboratorio se llevo a cabo en el Laboratorio de Serología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), ubicado en Bulevar Los Héroes y Calle Mártires del 30 de Julio, Ciudad Universitaria.

3.1.2. Duración de La Investigación.

La investigación se llevó a cabo, durante los meses de marzo a julio de 2008, y comprendió tres fases: levantamiento de un censo canino, recolección de las muestras y procesamiento de laboratorio.

3.1.3. Tipo de Explotación.

Las ganaderías lecheras en las cuales se realizó el estudio, poseen como características comunes: manejo estabulado o semi-estabulado, presencia de aborto. Los perros tienen acceso al área de manejo y de pasto (Figuras A2, A3 y A4).

Los encastes predominantes en dichas propiedades son de razas: Holstein, Brown Swiss y Jersey (Figura A5). Algunas ganaderías poseen razas con aptitud cárnica. (Figura A6).

3.2. Metodología estadística.

3.2.1 Variables a Estudiar:

- Seropositividad a *Neospora caninum*.
- Presencia de Anticuerpos contra *Neospora caninum* según la Edad.
- Presencia de Anticuerpos contra *Neospora caninum* según Sexo.
- Presencia de Anticuerpos contra *Neospora caninum* versus localidad muestreada.

3.3. Prueba de Chi – Cuadrada (X^2).

Cuando se recolectan una gran cantidad de datos, no es fácil especificar la distribución original. Para operar tales datos necesitamos utilizar una estadística de distribución libre, o sea de procedimientos que no dependan de una distribución original específica, lo cual se logra con la estadística no paramétrica; las cuales son sensibles a cambios en localización, dispersión o en ambas características. En general, estos métodos no se encuentran sujetos a la forma de distribución de la población.

Entre las ventajas que tenemos de usar Chi Cuadrada tenemos:

- Los datos se ordenan por categorías, por la falta de una escala de medición adecuada y que puede ser una forma de coleccionar los datos con prontitud usando categorías (Nuila, 2001; Daniel, 1997).

La fórmula general de Chi-cuadrada utilizada en la resolución de este tipo de problemas es: $X^2 = \sum \frac{(O - T)^2}{T}$

T

Donde O es el valor observado para cada una de dos o mas clases, y T es el valor teórico calculado.

La forma de calcular los grados de libertad es la siguiente:

$$GI = (N^{\circ} \text{ de filas} - 1) (N^{\circ} \text{ de columnas} - 1)$$

En el caso de un cuadro de 2 x 2 solo hay un grado de libertad.

Para evaluar esta expresión, primero debemos determinar el valor teórico calculado para cada clase de individuos, de acuerdo con nuestra hipótesis. El valor teórico calculado se sustrae entonces del valor observado y la diferencia resultante se eleva al cuadrado y se divide entre el valor teórico calculado. Estos cocientes se suman para todas las clases. Entonces, la suma se compara con los de una tabla de X^2 con los grados de libertad apropiados.

Esto revela la probabilidad aproximada de obtener desviaciones de las expectativas, tan grandes o mayores que aquellas observadas por casualidad.

Si el valor de X^2 obtenido es mayor que el valor crítico, se acepta la hipótesis planteada que afirma la existencia de diferencia significativa entre las frecuencias observadas.

3.4. Metodología de campo.

Se determinó una población canina doméstica de 130, los cuales poseen propietarios que habitan en las ganaderías y sus alrededores. Dentro de este censo no se discriminó: Edad, Sexo y Raza. En las tres ganaderías lecheras se realizaron inspecciones de campo para conocer datos como: prevalencia del aborto en cada ganadería, determinación de la población canina doméstica por medio de entrevistas a dichos pobladores (Figura A7).

3.4.1. Materiales y Equipo.

- Tubos de ensayo de 5 ml.
- Jeringas de 3 cc 22 X 1 ½.
- Vacuna antirrábica.
- Desparasitante (Ivermectina al 1%).

- Acepromacina 1%.
- Papel Toalla.
- Algodón.
- Alcohol 90%.
- Gradilla metálica.
- Bozal.
- Hielera.
- Atrapa perros.
- Gabachas.
- Guantes de cuero.
- Centrifuga portátil.
- Cuaderno de apuntes.

3.4.2. Toma de muestra.

Procedimiento:

- Se inmovilizaban los perros con ayuda del atrapa perro y se les colocaba el bozal (Figura A8).
- El propietario brinda datos para su identificación.
- Desinfección del área a muestrear.
- Recolección de muestra serológica tomada de la vena cefálica con jeringa de 3 cc de 22X1 1/2 (alrededor de 2 a 3 cc de sangre entera).
- Colecta de sangre en tubo de ensayo.
- Identificación de tubo de ensayo con respectiva muestra.
- Desparasitación y vacunación antirrábica.
- Transporte de la muestra.

3.5. Metodología de laboratorio.

- Centrifugación a 3500 rpm por un período de 5 minutos para obtener el suero.
- Separación y extracción de suero.
- Colocación del suero en microviales previamente identificados.
- Almacenamiento de las muestras en congelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Figura A9 y A10).

3.5.1. Materiales y equipo.

- Refrigerador.
- Congelador a -80°C .
- Centrífuga.
- Crioviales.

3.5.2. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

En 1941 Coons intentó conjugar los anticuerpos con colorantes fluorescentes y en 1942 publicó la primera aplicación de esta técnica inmunológica.

La microscopia de inmunofluorescencia es una técnica inmunohistoquímica que consiste en conjugar colorantes fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína, rodamina B de lisamina o ácido 1-dimetilaminonaftalen-5-sulfónico) con anticuerpos o antígenos, exponiendo después este conjugado a los anticuerpos o antígenos correspondientes en cortes de tejidos, frotis de microorganismos o de células, o cultivo de tejidos en capa única. Cuando la reacción es positiva y se expone a la luz ultravioleta se producirá fluorescencia observable bajo el microscopio de inmunofluorescencia.

Descripción del microscopio de inmunofluorescencia.

Consta de una fuente de luz (lámpara de mercurio o halógena) la cual debe emitir la mayor cantidad de luz ultravioleta, el microscopio y un sistema de filtros, el de excitación o selección de luz ubicado entre la fuente de luz y el preparado, tiene por objeto permitir el paso de ondas de luz con longitud que caiga en el rango azul con el fin que el preparado sea alcanzado exclusivamente por la luz azul y produzca emisión de luz fluorescente. El segundo filtro es el de calor y está ubicado entre la fuente de luz y el filtro de excitación en los microscopios de luz transmitida y entre la fuente de luz y el espejo dicrómico en los microscopios de luz incidente. El tercer tipo de filtro es de barrera, colocado antes del ocular para prevenir daños retinianos que podrían ser causados por rayos ultravioleta que escapan el espejo dicrómico.

Funcionamiento.

La luz de una fuente de longitud de onda múltiple se mueve a través de un filtro excitador que solo permite que pase la radiación excitada de la longitud de onda deseada. Esta radiación es reflejada por el filtro dicromático y enfocada por la lente del objetivo sobre la muestra, las moléculas fluorescentes de la muestra se excitan y emiten luz (por fluorescencia) de una longitud de onda específica y mayor. Esta luz es enfocada por el objetivo y la mayor parte pasa a través del filtro dicromático y no se refleja. Un filtro de barrera final bloquea toda la luz residual con la frecuencia de la radiación de excitación.

CLASES DE TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

- **DIRECTA:** Es una técnica que consiste en demostrar la presencia de un antígeno mediante reacción directa con un anticuerpo específico marcado con colorante fluorescente. El anticuerpo es obtenido a través de la inoculación del microorganismo productor del antígeno en un modelo animal.
- **INDIRECTA:** Es una técnica de doble capa en donde se aplica el anticuerpo sin marcar directamente sobre el sustrato de tejido y se visualiza por tratamiento con un suero anti-inmunoglobulina conjugado con fluorocromo.

El proceso consta de dos etapas: en la primera se fijan sobre un portaobjetos los antígenos que constituyen el sustrato conocido específico (células que contiene virus, *T. gondii*, *T. pallidum*, etc.) sobre él se coloca el suero de quien se sospecha la presencia de anticuerpos específicos, si la reacción es positiva se dará formación de complejo antígeno-anticuerpo no visible ya que el anticuerpo no estaba marcado.

En la segunda etapa se debe obtener una anti-inmunoglobulina marcada, que reaccionará con el anticuerpo del complejo producido en la primera etapa. La anti-inmunoglobulina se obtiene así: de una mezcla de varios sueros, se precipitan las globulinas (anticuerpo), estas globulinas son inoculadas a un organismo (conejos, cabras), el organismo producirá antiglobulinas que se marcan con fluoresceína o cualquier otro de los colorantes. Este anticuerpo marcado se unirá al anticuerpo no marcado de la primera etapa que en este momento se puede considerar como un antígeno, dando reacción positiva de fluorescencia solamente si en la primera etapa se produjo unión entre el antígeno que se fija en la placa y el anticuerpo presente en el suero que estamos evaluando.

La técnica indirecta tiene ventajas: la inmunofluorescencia es más brillante que la detección directa debido a que varias anti-inmunoglobulinas fluorescentes se pueden unir a cada una de las moléculas de Antígeno-anticuerpo presentes en la primera capa, además dado que el proceso de conjugación es largo, se ahorra tiempo cuando se estudian varios sueros para la determinación de anticuerpo ya que sólo es necesario prepara un único reactivo marcado: la anti-inmunoglobulina. (Schwartz, 2000).

3.5.2.1. Material Requerido.

- Lamina sustrato FA Neospora caninum. (Figura A11).
- Conjugado FITC Neospora caninum.
- Control negativo Neospora caninum. (origen canino).
- Control positivo Neospora caninum. (origen canino).
- Buffer especial diluyente de suero.
- Solución buffer de lavado.
- Liquido de montaje.
- Papel absorbente.
- Marcador indeleble.
- Agitador.
- Cronómetro.
- Cámara húmeda.
- Frascos Kooplin.
- Crioviales de 3 ml.
- Pipetas pasteur.
- Bulbos.
- Guantes y tapabocas.
- Gradilla portaviales.
- Puntas descartables de 100 y 300 µlts.

3.5.2.2. Equipo.

- Micropipetas individual, 5 – 50, 50 – 200 y de 200 – 1000 microlitros.
- Refrigerador.
- Congelador (-80°C).
- Estufa (Incubadora).
- Centrífuga.
- pH metro.
- Microscopio Epi-fluorescente.

3.5.2.3. Metodología de Laboratorio.

a) PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

- Se dejó que todos los reactivos alcanzaran la temperatura ambiente.
- Dilución de 1:50 en los sueros problemas (Figura A12).
- La lámina previamente identificada se dejó a temperatura ambiente.
- Colocar los controles positivo y negativo en un pozo determinado (Figura A13).
- Colocar de 10-50 µl del suero problema en cada pozo designado. (Figura A14).
- Identificación de suero problema por medio de mapa (Figura A15).
- Incubar la lámina en cámara húmeda a 37 °C por 30 minutos (Figura A16).
- Lavar las láminas en frascos Kooplin con solución Buffer de lavado por 10 minutos (Figura A17).
- Secar las láminas con mucho cuidado de no tocar los pozos (Figura A18).
- Colocar de 20-50 µl de conjugado en todos los pozos incluyendo los controles positivo y negativo.
- Incubar nuevamente las láminas a 37° C por 30 minutos.

- Lavar nuevamente las láminas en frascos Kooplin con solución Buffer de lavado por 10 minutos.
- Secar las láminas con mucho cuidado de no tocar los pozos con papel toalla.
- Agregar de fluido de montaje en el centro de toda la lamina y luego colocar una lamina cubre-objeto para ser observadas al microscopio (Figuras A19 y A20).

3.5.2.4. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS.

Se utilizó la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) para determinar anticuerpos contra *Neospora caninum*. Se usó una dilución de 1:50 empleando como antígeno a taquizoítos formalizados (Cepa Nc- 1) y conugado comercial VMRD® - USA.

Los anticuerpos contra *Neospora caninum* fueron determinados mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). La positividad del suero fue considerada al observarse fluorescencia completa del taquizoíto (Figura A21), mientras que en la muestra negativa no se aprecia tal fluorescencia.

4. RESULTADOS.

Se analizó un total de 103 sueros caninos de igual número de perros muestreados, procedentes de tres ganaderías lecheras del departamento de Sonsonate, el muestreo demostró homogeneidad con respecto al sexo de los caninos, con un 51% de las hembras (53) y 49% de los machos (50). La mayoría de ellos de raza indefinida (mixtados) (Grafico 1).

Para el procesamiento de los datos se estratificaron las edades de la siguiente manera: menores de 1 año con un 30% (31); de 1 a 2 años con un 23% (24); de 3 a 5 años con un 28% (29); de 6 a 8 años con un 11% (11) y de 9 a 12 años con un 8% (8) (Grafico 2).

El 11% (11) de la población canina total resultó con presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* (Grafico 3).

El análisis estadístico indica que el sexo, edad y localidad de los caninos, no resulta significativo cuanto a la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* (Cuadro A1, A2 y A3).

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

En todas las unidades productivas del presente estudio persiste el aborto bovino; en las cuales se han realizado pruebas de brucelosis y Leptospirosis, resultando negativas, hay alta probabilidad que el aborto este asociado a la Neosporosis, teniendo como antecedente que fueron las de mayor seropositividad en la investigación realizada por Cuellar *et al.* (2002).

El 66% (2) de las localidades ganaderas, presentó al menos un perro seropositivo a Neosporosis, cabe mencionar que en donde no se encontró anticuerpos contra *Neospora caninum* poseen control de erradicación de caninos que transitan en dicha explotación pecuaria.

Las ganaderías lecheras tienen características peculiares y particulares, por lo cual se procedió a dividir en ganaderías con asentamiento netamente rural (2), y ganaderías situadas en localidad urbano-marginal (1).

En las ganaderías de localidad rural presentaron el 18% (2) de presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum*, mientras que en la ganaderías de localidad urbano-marginal presentó un 82% (9) de presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum*; dicha ganadería presento el 73% (75) de los sueros colectados ya que tenia alta densidad poblacional y en nuestro país se relaciona la cantidad de número de perro por domicilio.

De acuerdo al sexo de los caninos no se encontró diferencia significativa, la cual coincide con la literatura consultada.

Ya que la presencia de anticuerpos de acuerdo a esta variable fue: machos seropositivos 55% (6) y hembras seropositivas 45% (5).

Las edades de la población canina que resultaron positivos a *Neospora caninum*: de 1 a 2 años; 18% (2), de 3 a 5 años; 55% (6) y de 9 a 12 años; 27% (3). Cuyo resultado estadístico no es significativo

6. CONCLUSIONES.

- Los resultados positivos mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta demuestran que existe evidencia de presencia de la *Neospora caninum* en perros que habitan y transitan en las ganaderías estudiadas del Departamento de Sonsonate.
- No existe correlación directa entre la presencia de anticuerpos entre las ganaderías y el sexo del *canis domesticus*.
- Estadísticamente nos es significativa la relación de la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en la edad de los caninos y localidades ganaderas estudiadas.
- De acuerdo a los resultados, puede presentarse reactores positivos independientemente en la ubicación del hato.
- Aparentemente puede existir una correlación entre la Neosporosis bovina con hallazgo de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en perros que habitan y transitan en ganaderías lecheras con antecedentes de problemas reproductivos y abortos.

7. RECOMENDACIONES.

- Investigar sobre el status serológico de Neosporosis de hatos ganaderos tanto en bovinos y caninos, en otras regiones del país.
- Promover trabajos de tesis comparando poblaciones caninas rurales y urbanas, principalmente en rastros municipales ya que en El Salvador existe movilización activa de ganado.
- Evitar en los hatos ganaderos el consumo de las secreciones, placenta o fetos abortados de bovinos por los perros.
- Impedir el ingreso a la ganaderías de los perros a las fuentes de alimento de los bovinos para evitar la transmisión horizontal, así como de otros animales hospederos potenciales del *N. caninum*.
- Incorporar estudios de Neosporosis bovina sobre la transmisión vertical en explotaciones pecuarias con abortos no definidos.
- Se recomienda que una vez evidenciado la presencia de Neosporosis se implementen planes profilácticos para el control de dicha enfermedad.

- Difundir la información de la Neosporosis dirigida al campo de pequeñas especies así como al campo productivo.
- Incentivar a las entidades pertinentes para promover la vigilancia epidemiológica e incorporar pruebas rutinarias para el diagnóstico de la Neosporosis.

8. BIBLIOGRAFIA.

1. Barber, J; Payne-Johnson, C; Trees, A. 1996. Distribution of *Neospora caninum* within the central nervous system and other tissues of six dogs with clinical Neosporosis. (En línea). Liverpool, Bélgica. Consultado 23 mayo 2008. Disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119205020/abstract>
2. Barber, S; Van Ham, L; Polis, I; Trees, J. 1997. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* in Belgian dogs. (en línea). Liverpool, Bélgica. Consultada 12 enero 2008. Disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119145831/abstract?CRETRY=1&SRETRY=0>
3. Barr, B; Bjerksås, I; Buxton, D; Conrad, P; Dubey, J; Ellis, J; Johnston, S; Lindsay, D; Trees, A; Wouda, W. 1997. Neosporosis. Report of the international Neospora Workshop. The compendium. (en línea). Consultado 11 abril 2008. Disponible en: <http://veterinaryrecord.bvapublications.com/cgi/content/abstract/150/17/538>
4. Basso, W; Venturini, MC; Venturini, L; Kienast, M; Unzaga, JM; Bacigalupe, D; Perfumo, C. 2004. Estudio molecular y aislamiento de *Neospora caninum* en un caso clínico de neosporosis canina. (en línea). Argentina. Consultada 14 abril 2008. Disponible en: <http://www.org/panvet2004/Doc/409>

5. Benito, R; Gil, J. ?. Serie: Técnica de inmunofluorescencia (IF). (en línea). Zaragoza, España. Consultado 25 junio 2008. Disponible en: <http://www.imagenmed.com/especiales/ie9/if.html>

6. Bergeron, N; Fecteau, G; Paré, J; Martineau, R ; Villeneuve, A. 2000. Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Quebec. (en línea). Consultado 2 enero 2008. Disponible en: http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/78- neosporosis_definicion.pdf

7. Bergeron, N; Girard, C; Pare, J; Fecteau, G; Robinson, J; Baillargeon, P. 2001a. Rare detection of *Neospora caninum* in placentas from seropositive dams giving birth to full-term calves. (en línea). Montreal, Canadá. Consultado 23 mayo 2008. Disponible en: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=14164967>

8. Bergeron, N, Fecteau, G; Villeneuve, A; Girard, C; Pare, J. 2001. Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. (en línea). Montreal, Canadá. Consultado 25 junio 2008. Disponible en: <http://www.interconnect.com/content/els/03044017/2001/00000097/00000002/art00396>

9. Bildfell, B; Davidson, J; Dubey, J. 1994. Neospora induced protozoal bovine abortion in Prince Edward Island. (En línea). Consultado 28 de mayo 2008. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1686727>

10. Björkas I.; S. Mohn; J. Prestus. 1984. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. (en línea). Norway, USA. Consultado 21 abril 2008. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/g7751242gx13p35m/>

11. _____ b; Presthus, J. 1989. The neuropathology in Toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. (en línea). ? Consultado 5 abril 2008. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2730788>

12. Burna, AN; Lertora, WJ; Catuogno, MS. 2004. Diagnóstico histopatológico de aborto bovino por *Neospora caninum*. (en línea). Argentina. Consultado 22 octubre 2007. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2004/4-Veterinaria/V-024.pdf>

13. Buxton, D; Maley, SW; Innes, EA; Pastoret, P-P; Brochier, B. 1997. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. (En línea). Bélgica. Consultado 24 mayo 2008. Disponible en: <http://veterinaryrecord.bva-publications.com/cgi/content/citation/141/12/308>

14. Campo, J del; Chávez, A; Delgado, A; Falcón, N; Ornelas, A; Casas, E; Serrano, E. 2004. Frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del Valle de Lima. (en línea). Lima, Perú. Consultado 17 febrero 2008. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/riverp/v14n2/a08v14n2.pdf>

15. Cole, R; Lindsay, D; Blagum, B; Sorjonen, D; Dubey, J. 1995. Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs. (en línea). Consultado 26 mayo 2008. Disponible en: http://www.patologiaveterinaria.cl/monografias/MEPAVET1-2005/MEPAVET08_archivos/page0015.htm

16. Circulo de Médicos Veterinarios del Sur de Santa Fe. 2003. Neosporosis. (en línea). Argentina. Consultado 23 mayo 2008. Disponible en: <http://www.veterinariosursf.com.ar>

17. Cornejo P, NJ. 2002. Seroprevalencia de *N. caninum* en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del valle del Mantaro. (en línea). Perú. Consultado 5 abril 2008. Disponible en: http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2004/cornejo_pn/html/index-frames.html

18. Cuellar, KR; López, CD; Romero, LE. 2004. Evidencia Serológica de *Neospora caninum* en vacas con historial de abortos en once ganaderías lecheras de la zona Centro-Occidental de El Salvador: Tesis. Lic. Med. Vet. San Salvador, El Salvador. UES.
19. Daniel, W. 1997. Bioestadística: Bases para análisis de las ciencias de la salud. 3 ed. DF, México. Limusa. p. 365-434.
20. Dubey, JP; Carpenter, JL; Speer, CA. 1988a. Newly recognised fatal protozoan disease of dog. (en línea). J. Am. Vet. Med. Assoc. Consultado 17 abril 2008. Disponible en: [http://www.actaparasitologica .pan pl/archive /PDF/Dubey.pdf](http://www.actaparasitologica.pan.pl/archive/PDF/Dubey.pdf)
21. _____b; Hattel, AL; Lindsay, DS; Topper, MS. 1988b. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative organism and experimental transmission. J. Am Vet. Med. (en línea). Consultado 14 abril 2008. Disponible en: [http://www.actaparasitologica.pan.pl/ /archive/PDF/Dubey.pdf](http://www.actaparasitologica.pan.pl/archive/PDF/Dubey.pdf)
22. _____c; 1999. Recent advances in Neospora and Neosporosis. (en línea). USA. Consultado 28 de mayo 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TD73WY3XNGD&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=c6229d32bda9b33b3d654b590f9deca8

23. _____d; 2003. Review of *Neospora caninum* and Neosporosis en animals. (en línea). Maryland, USA. Consultado 17 marzo 2008. Disponible en: <http://www.koreamed.org/SearchBasic.php?RID=323948&DT=1>
24. _____e; Knickman, E; Greene, CE. 2005?, Neonatal *Neospora caninum* infections in dogs. (en línea). GA, USA. Consultado 28 febrero 2008. Disponible en: <http://www.actaparasitologica.pan.pl/archive/PDF/Dubey.pdf>
25. Estudio de antígenos de superficie por inmunofluorescencia directa o indirecta mediante citometría de flujo. ?. (en línea). Consultado 5 septiembre 2007. Disponible en: <http://www10.uniovi.es/citometria/Aplicacion1.htm>
26. Fort, M. 2001. *Neospora caninum*: Estudio seroepidemiológico en bovinos de la provincia de La Pampa. (en línea). La Pampa, Argentina. Consultado 8 febrero 2008. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/anguil/info/publicaciones/pdf/publi52.pdf>
27. Fritz, D. 1997. *Neospora caninum*: associated nodular dermatitis in a middle-aged dog. (en línea). Consultado 28 febrero 2008. Disponible en: <http://www.fao.org/agris/search/display.do?f=../1997/v2324/US9742266.xml;US9742266>

28. García, F; Aguado, E; Peña, J. 2006. Inmunoglobulinas: Estructura Isotipos Dominios Subclases Alotipos Idiotipos Distribución Función Propiedades Unión Ag-Ac, IgG y otras. (en línea). ?. Consultado 5 junio 2008. Disponible en: <http://www.capitulodeinmunología-online/coordinador/peña>
29. Gondim, L; Gao, L; McAllister, M. 2002. Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. (en línea). Consultado 23 mayo 2008. Disponible en: <http://www.jstor.org/pss/3285488>
30. Gottstein, B. 2002?. *Neospora caninum*: Causa de aborto en bovinos, institute of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine and Faculty of Medicine. University of Bern. Trad. Susana Conigliaro. (en línea). Consultado 12 enero 2008. Disponible en: <http://www.cdvsa.com.ar/Images/pdf/Neosporosis.pdf>
31. Horna, S; Chávez V, A; Casas AE; Serrano M, E. 2005?. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en caninos de dos distritos de La Provincia de Chachapoyas. (en línea). Lima, Perú. Rev Inv Vet Perú. Consultado 25 de enero de 2008. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v14n2/a09v14n2.pdf>

32. Innes, E; Andrianarivo, A; Bjorkman, C; Williams, D; Conrad, P. 2002. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. Trends Parasitol. (en línea). ?. Consultado 23 mayo 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6W7G-7C32N3D&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=6e18b8ff0f8b56900524a2c3c3f03d74
33. Innes, E; Wright, S; Maley, S; Rae, A; Schock, A; Kirvar, E; Bartley, P; Hamilton, C; Carey, I; Buxton, D. 2001. Protection against vertical transmission in bovine Neosporosis. (en línea). ?. Consultado 4 mayo 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T7F-447KS1-&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=8f37604de43d07f9761c36b59ad72245
34. Inmunoenzimática. (en línea). Ecuador. Consultado 7 agosto 2007. Disponible en: http://64.233.169.104/search?q=cache:hW9ByJ5UMac:www.intervet.com.ec/Binaries/63_78653.doc+Determinaci%C3%B3n+de+la+presencia+de+anticuerpos+a+Neospora+caninum+en+hatos+lecheros+de+la+sierra+Centro+Norte+del+Ecuador,+por+Prueba+Inmunoenzim%C3%A1tica+*&hl=en&ct=clnk&cd=1&gl=
35. Jackson, W; Lahunta, A de; Alaska, J; Cooper, B; Dubey, J. 1995. *Neospora caninum* adultt dog with progressive cerebellar signs. (en línea).

- Consultado 4 mayo 2008. Disponible en: <http://www.fao.org/agris/search/display.do?f=. /1997/v2304/US9627239.xml;US9627239>
36. Lindsay, DS; Blagburn, BL; Dubey, JP. 1990. Infection of Mice with *Neospora caninum* (Protozoa: Apicomplexa) Does Not Protect against Challenge with *Toxoplasma gondii*. (en línea). USA. Consultado 22 febrero 2008. Disponible en: <http://www.pudmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=258878&blobtype=pdf>
37. Lorenzo, V; Fumarola, M; Siso, S. 2002. Neosporosis with cerebellar involvement in an adult dog. (en línea). ?. Consultado 23 mayo 2008. Disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/118943998/abstract>
38. Lozada, EF. 2004. Determinación de la presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en hatos lecheros de la sierra Centro Norte del Ecuador por Prueba. Ecuador. Consultado 25 mayo 2008. Disponible en: http://64.233.169.104/search?q=cache:hW9By5UMacJ:www.intervet.com.ec/Binaries/63_78653.doc+Determinaci%C3%B3n+de+la+presencia+de+anticuerpos+a+Neospora+caninum+en+hatos+lecheros+de+la+sierra+Centro+Norte+del+Ecuador,+por+Prueba+Inmunoenzim%C3%A1tica+*&hl=en&ct=clnk&cd=1&gl=
39. Marsh, E; Barr, C; Packham, E; Conrad, A. 1998. Description of a new *Neospora* species (Protozoa: apicomplexa: Sarcocystidae). (en línea). Columbia. USA. Consultado 2 abril 2008. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794642>

40. Marsh, AE; Otter, A; McGarry, J; Buxton, D. 2002. Serological investigation of aborted sheep and pigs for infection by *Neospora caninum*: (en línea). Consultado 4 mayo 2008. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794642>
41. Mcallister, MM; Dubey, JP; Lindsay, DS; William, RL; Willis, RA; Guire, AM. 1998. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. (en línea). Consultado 6 mayo 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?__ob=ArticleURL&_udi=B6T7F-3W1RGB1-21&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=8dc0d850609edd407fb4a97b9e0dc30d
42. Microscopia de Inmunofluorescncia. 2000. (en línea). ?. Consultado 4 julio 2007. Disponible en: <http://www.kcl.ac.uk/kis/schools/lifessciences/biomed/bscb/gallery.html>
43. Moore, DP. 2006. Actualización en neosporosis bovina. (en línea). Argentina. Consultado 27 agosto 2007. Disponible en: <http://www.monografíaselectrónicasdepatologíaveterinariavol.2Nº1-2005;17-33>
44. Muñoz, CR. 1992. Guía para Trabajo de investigación universitaria. 3 ed. San Salvador, El Salvador. Publitex. p. 118-179.

45. Naguleswaran, A; Cannas, A; Keller, N; Vonlaufen N; Björkman, C; Hemphill, A. 2002. Vero cell surface proteoglycan interaction with the microneme protein NcMIC(3) mediates adhesion of *Neospora caninum* tachyzoites to host unlike then in *Toxoplasma gondii*. (en línea). ?. Consultado 4 mayo 2008. Disponible en: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=13618809>
46. Nuila, MJ. 2001. Guía de estudio sobre la prueba de Chi Cuadrada. UES (Universidad de El Salvador), Facultad de Ciencias Agronómicas. p. 1-23.
47. Obendorf, D; Murray, N; Veldhuis, G; Munday, B; Dubey, J. 1995. Abortion caused by neosporosis in cattle. (en línea). ?. Consultado 14 mayo 2008. Disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/journal/119233399/abstract>
48. Ortega, L. 2006. Pruebas serológicas. (en línea). España. Consultado 6 febrero 2008. Disponible en: <http://www.exopol.com/general/circulares/187.htm>
49. Pabón, M; López G, F; García I, I; Bech S, G; Nogareda, C; Almería, S. 2007?. Repetición de abortos asociados a *Neospora caninum*: Estudio en una explotación durante 3 años. (en línea). Barcelona. España. Consultado 21 abril 2008. Disponible en: http://www.aida-itea.org/jornada38/patologia_parasitaria/

50. Patitucci, AN; Phil, M; Pérez, MJ; Rozas, MA; Israel, KF. 2008. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. (en línea). Chile. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco. Consultado 24 de abril de 2008. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php>
51. _____b; Phil, M; Pérez, MJ; Israel, KF; Rozas, MA. 2008. Prevalencia de anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en dos rebaños lecheros de la IX Región de Chile. (en línea). Chile. Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Católica de Temuco. Consultado 17 marzo 2008. Disponible en: http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X20000002000008&lng=es&nrm=iso
52. Pérez Z, FJ. 2005. Variabilidad adaptativa y patogénica en "*Neospora caninum*". (en línea). Argentina. Tesis, Doctor en Medicina Veterinario. Consultado 14 mayo 2008. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/5362/>
53. Pérez, V; Corpa, J; Ortega-Mora, L; Pereira-Bueno, J. 1999. Patología e inmunidad. En: Patología de la reproducción de etiología parasitaria (II) Neosporosis. (en línea). España. Consultada 26 de mayo. Disponible en: http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/curriculum/c_juan.manuel.corpa.arenas.html

54. Perle, la K; Piero, F Del; Carr, R; Harris, C; Stromberg, P. 2001. Cutaneous neosporosis in two adult dogs on chronic immunosuppressive therapy. (en línea). J. Vet. Diagn. Invest. ?. Consultado 22 febrero 2008. Disponible en: <http://jvdi.org/cgi/content/abstract/13/3/252>
55. Rojas, CM. 2003. Neosporosis canina. Rev virt parasitol vet Perú. (en línea). Perú. Consultado 14 abril 2008. Disponible en: <http://www.visionveterinaria.com/tpp.htm>.
56. Sawada, M; Park, C; Kondo, H; Morita, T; Shimada, A; Yamane, I; Umemura, T. 1998. Serological survey of antibody to *Neospora caninum* in Japanese dogs. (en línea). Japón. Consultado 14 mayo 2008. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9713815>
57. Schares, G; Peters, M; Wurm, R; Tackmann, K; Henning, K; Conraths, F. 1997. *Neospora caninum* verursacht aborte in einem Rinderbestand in Nordrhein-Westfalen. (en línea). Consultado 14 mayo 2008. Disponible en: http://www.sciencedirect.com/science?_ob=articleURL&_udi=B6TD73V8VB1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=93b49c1e13684168d5b02b9b5267576d

58. Valenzuela, P. 2005. NEOSPOROSIS EN BOVINOS Y CANINOS. (En línea). Chile. Consultado 17 abril 2007. Disponible en: http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET1-2005/MEPAVET08_archivos/page0015.htm
59. Wouda, W; Moen, A; Schukken, H. 1998. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. (en línea). ?. Consultado 14 mayo 2008. Disponible en: http://www.ingentaconnect.com/els/0093691_x/1998/00000049/00000007/art00078;jsessionid=3ndp9dpnbr7tb.alice?format=print
60. Zabala, J; Loste, JM; Bautista, I; Busquets, P; Caballero, J; Sitja, M. 2002?. Valoración de la transmisión vertical de *Neospora caninum* mediante el estudio serológico materno y precalostral en explotaciones de vacuno lechero. (en línea). España. Consultado 17 abril 2008. Disponible en: <http://www.anembe.com/congresos/indice.cgi?folder=2002&next=2>
61. Zambrano, JL; Cotrino, B; Jiménez, C. 2000?. Neosporosis. (en línea). Bogotá, Colombia. Consultado 23 julio 2008. Disponible en: <http://encolombia.com/veterinaria/acovez26101evaluacion.htm>

ANEXOS.

FIGURA A1
UBICACION GEOGRAFICA DE LAS GANADERIAS LECHERAS ESTUDIADAS

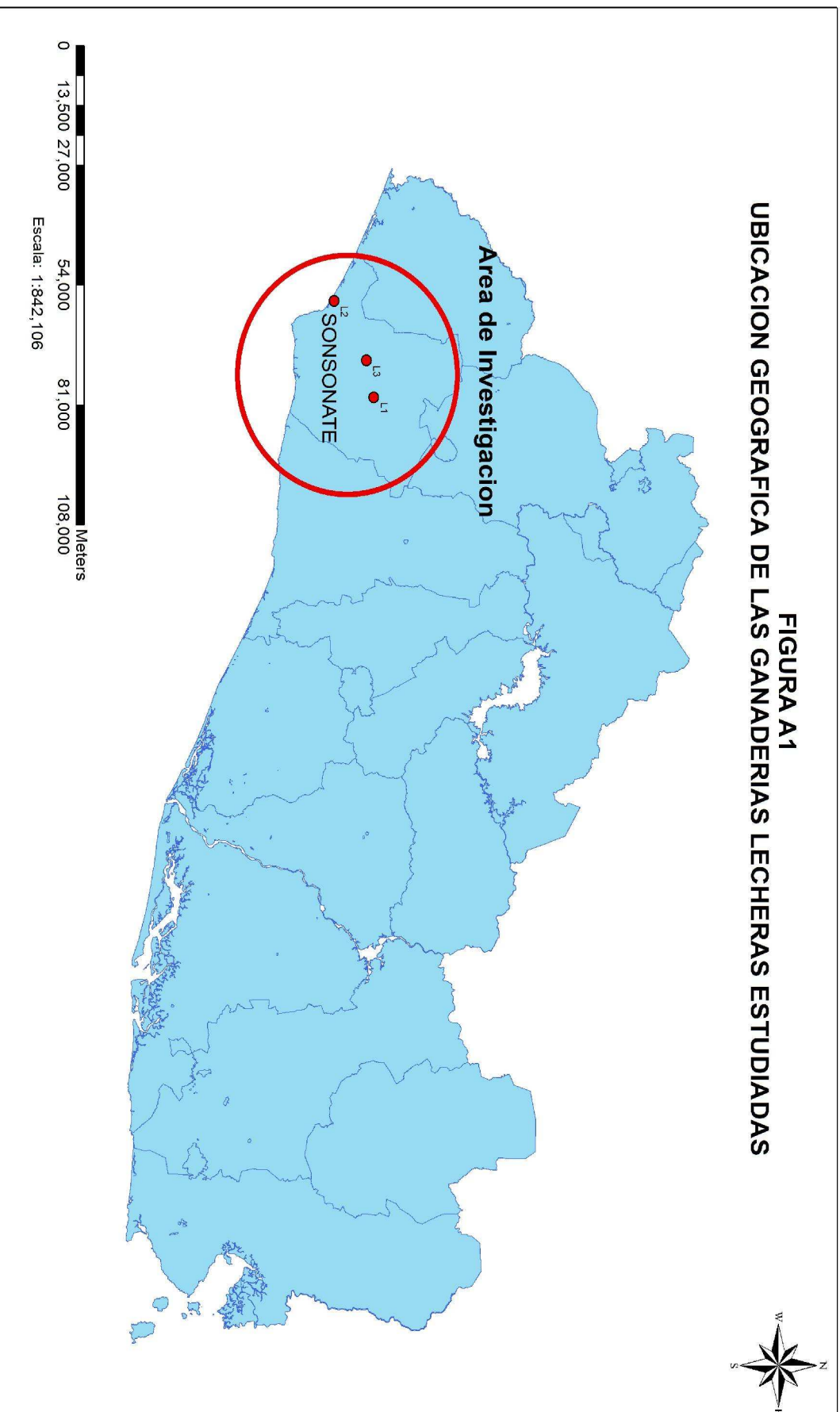




Figura A2. Los perros tienen acceso al área de alimentación del hato.



Figura A3. Los perros tienen acceso hasta al área de parto.



Figura A4. Perro en área de pasto de corte.



Figura A5. La mayoría de las ganaderías estudiadas poseían vacas de encaste predominante de raza Holstein.



Figura A6. Bovinos con propósito de engorde.

No se han realizado estudios de la presencia de Neospora en este tipo de hatos.

FIGURA A7.

Formato de encuestas para propietarios de perros en ganaderías.

ENCUESTA N° _____

Realizada por: _____ Fecha: _____

En vivienda: _____ o Explotación: _____

Datos proporcionados por: _____

Nombre de la propiedad: _____

Dirección: _____

1. ¿Posee PERROS en su propiedad?

SI _____ NO _____

2. ¿Cuántos son? _____

MACHOS _____ HEMBRAS _____

3. ¿Qué edad tiene?

a) 0-11 m ____ b) 1-2 a ____ c) 3-5 a ____ d) 6-8 a ____ e) 9-12 a ____

4. ¿Qué raza son? a) _____ b) _____ c) _____

5. ¿Permanece en otro lugar su mascota además de esta?

SI _____ NO _____

6. ¿Tienen un esquema de vacunación sus mascotas?

SI _____ NO _____

7. ¿Qué vacunas le aplica?

PARV. ____ DOBLE ____ TRIPLE ____ QUINT. ____ OTRA _____

8. ¿Cada cuanto tiempo lo hace?

6 m _____ 1 a _____ 2 a _____ más tiempo _____

9. ¿Desparasita a sus mascotas?

SI _____ NO _____

10. ¿Qué producto utiliza? _____

11. ¿Ha observado en sus mascotas, signos nerviosos como:

DIFICULTAD AL COMER SI _____ NO _____

PARALISIS SI _____ NO _____

INCORDINACION AL CAMINAR SI _____ NO _____

ABORTO SI _____ NO _____

12. ¿Ha observado otro signo?

SI _____ NO _____

13. ¿Cuál o como se manifiesta? _____



Figura A8. Inmovilización y toma de muestra serológica de perro que permanecía alrededor de la ganadería.



Figura A9. Muestras de suero canino debidamente identificado, almacenado en microviales de 3 ml.



Figura A10. Almacenamiento de sueros en congelador a -80°C .



Figura A11. Lámina sustrato FA *Neospora caninum*. En cada pozo Contiene taquizoítos cepa NC-1.

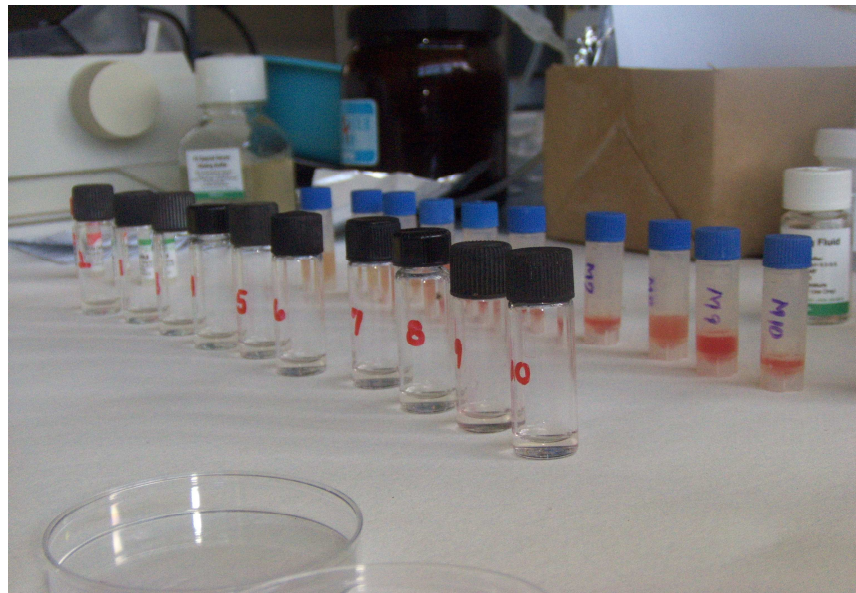


Figura A12. Dilución de sueros 1:50. Esta dilución se conseguida con una solución buffer especial incluida en test de diagnostico.

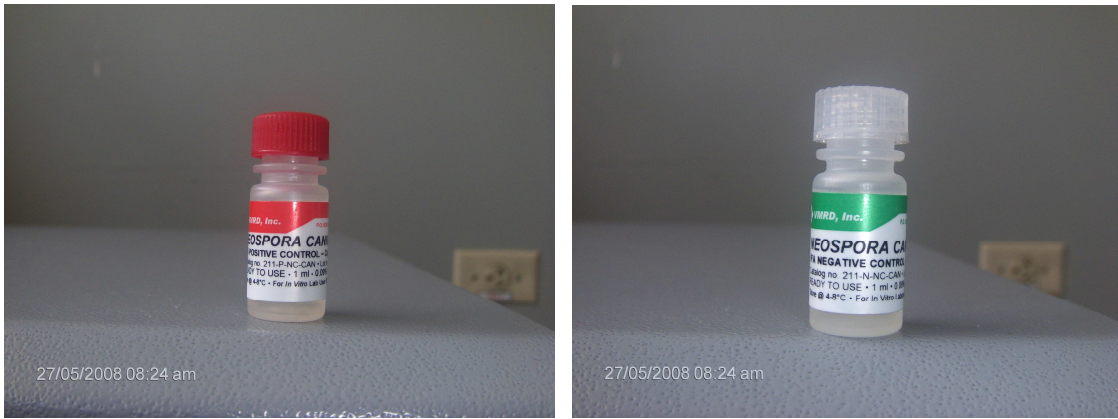


Figura A13. Controles positivo y negativo. Los reactivos se conservaban a una temperatura de 5°C.



Figura A14. Colocación de 30 µl de suero problema en cada poso previamente identificado por un mapa para inmunofluorescencia.

Figura A15. Mapa para identificación de láminas y sueros.

Neospora caninum

Lámina N° _____

Fecha: _____

12	+	1	2	3	4	5	6
	-	7	8	9	10	11	

Neospora caninum

Procesado por: _____

Revisado por: _____

Observaciones:



Figura A16. Incubación de la lámina por 30 minutos a 37°C.

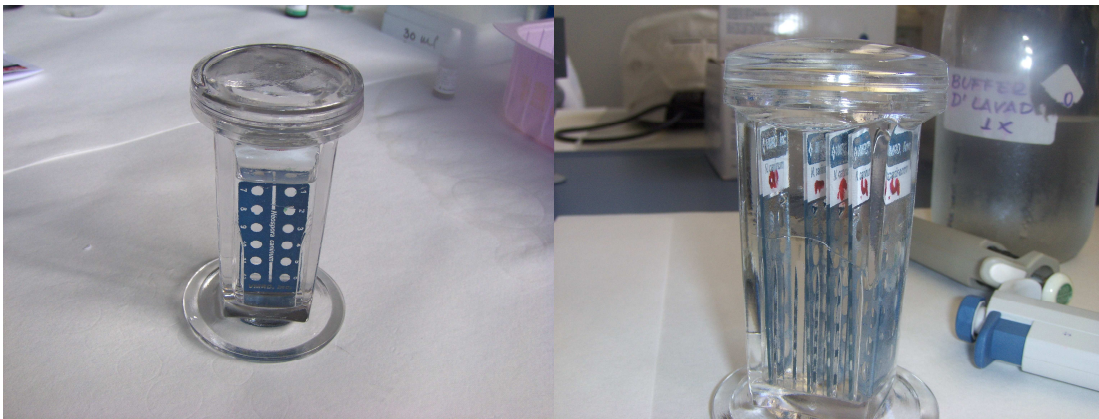


Figura A17. Lavado de las laminas por 10 minutos en frascos koplín.

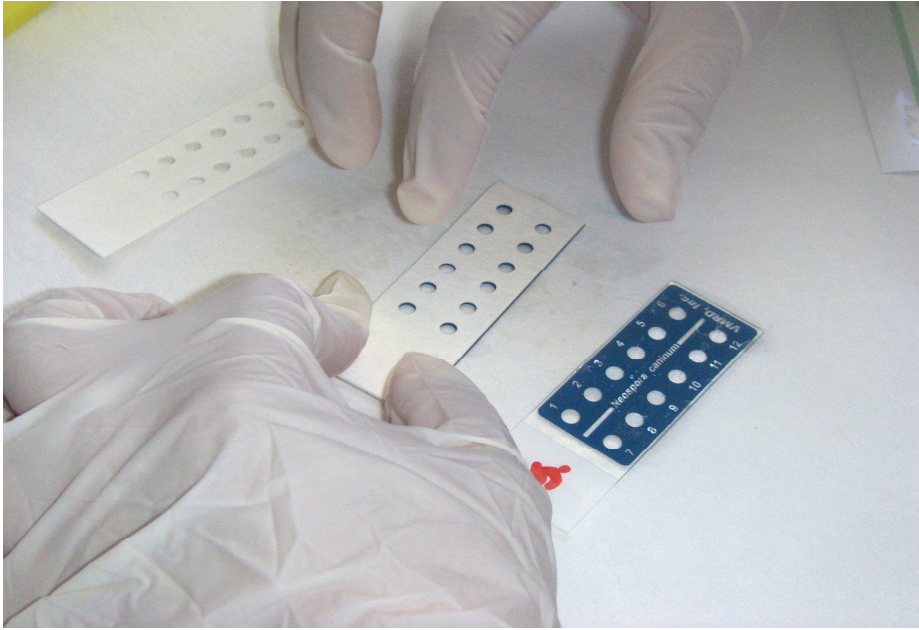


Figura A18. Secado de lámina con papel absorbente especial.



Figura A19. Aplicación del líquido de montaje.



Figura A20. Observación de la lámina en objetivo 40 X con microscopio Epi-fluorecente.

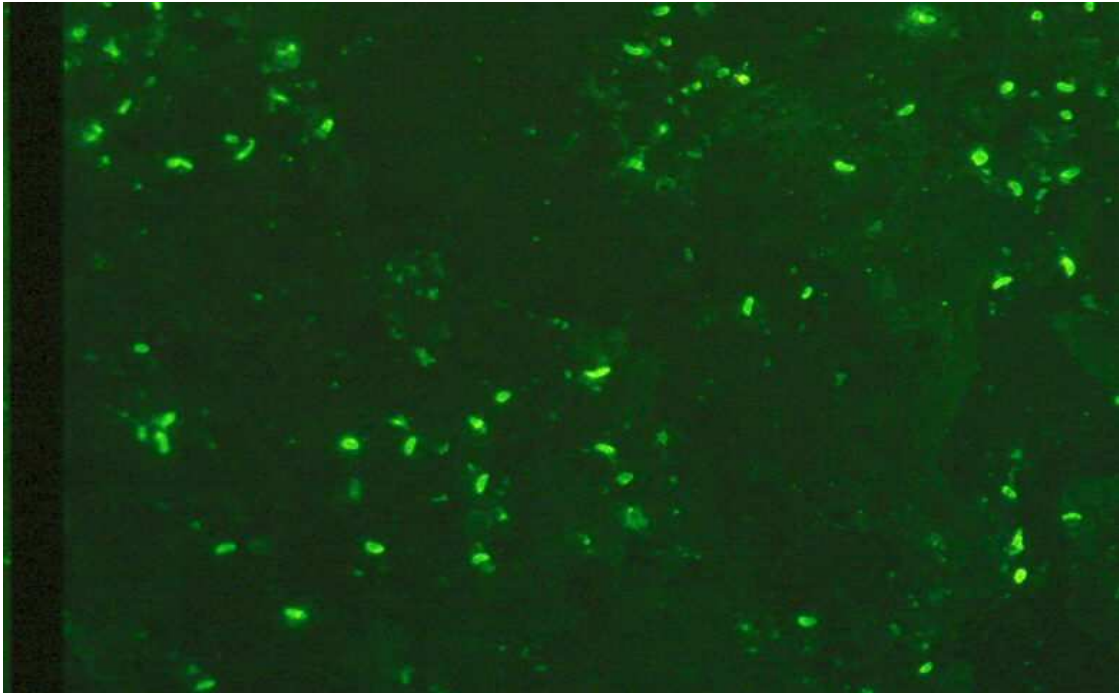


Figura A21. Obsérvese la fluorecencia completa del taquizoíto de *N. caninum*.

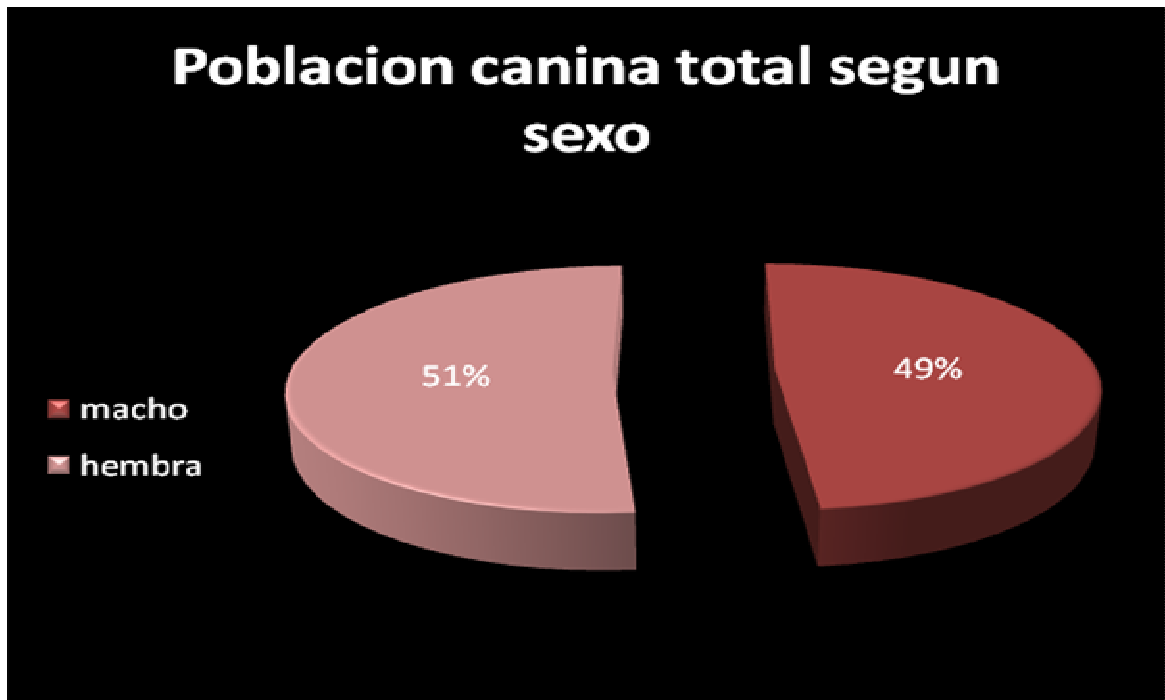


Grafico 1. Se observa que la poblacion estudiada según el sexo es homogénea.

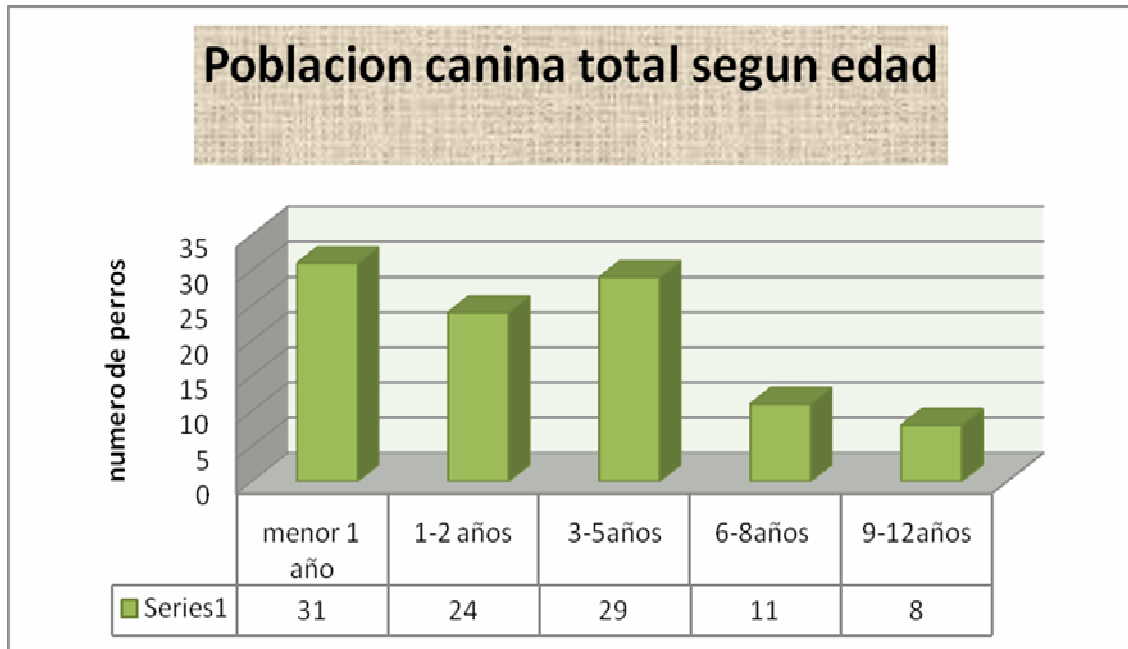


Grafico 2. Distribucion de las Edades de los perros muestreados.

CUADRO A 1
PRUEBA DE CHI – CUADRADA (X²).
TOTAL DE ANIMALES 103

ESTATUS SEROLOGICO	GANADERIA 1	GANADERIA 2	GANADERIA 3	TOTAL
SEROPOSITIVOS (ESPERADOS)	0 (1.07)	2 (1.92)	9 (8.01)	11
SERONEGATIVOS (ESPERADOS)	10 (8.93)	16 (16.1)	66 (67)	92
TOTAL	10	18	75	103

Valor teórico de calculado de perros positivos en ganadería 1:

$$(10 \times 11) / 103 = 1.07$$

Valor teórico de calculado de perros positivos en ganadería 2:

$$(18 \times 11) / 103 = 1.92$$

Valor teórico de calculado de perros positivos en ganadería 3:

$$(75 \times 11) / 103 = 8.01$$

Valor teórico de calculado de perros negativos en ganadería 1:

$$(10 \times 92) / 103 = 8.93$$

Valor teórico de calculado de perros negativos en ganadería 2:

$$(18 \times 92) / 103 = 16.1$$

Valor teórico de calculado de perros negativos en ganadería 3:

$$(75 \times 92) / 103 = 67$$

$$\text{Chi – cuadrada } f_1 = ((0 - 1.07)^2 / 1.07) = 1.07$$

$$\text{Chi - cuadrada f 2} = ((2 - 1.92)^2 / 1.92) = 0.003$$

$$\text{Chi - cuadrada f 3} = ((9 - 8.01)^2 / 8.01) = 0.12$$

$$\text{Chi - cuadrada f 4} = ((10 - 8.93)^2 / 8.93) = 0.13$$

$$\text{Chi - cuadrada f 5} = ((16 - 16.1)^2 / 16.1) = 0.0006$$

$$\text{Chi - cuadrada f 6} = ((66 - 67)^2 / 67) = \underline{0.01}$$

$$\text{TOTAL} = 1.3336$$

$$\text{Chi - cuadrada calculado} = \mathbf{1.3336}$$

$$\text{Chi - cuadrada tabla} = \mathbf{5.99}$$

CUADRO A 2

PRUEBA DE CHI - CUADRADA (X²).

PRESENCIA DE ANTICUERPOS DE ACUERDO A EDAD Y SEXO DE LOS CANINOS.

	< 1 Año	1 - 2 Años	3 - 5 Años	6 - 8 Años	9 - 12 Años	TOTAL
MACHOS (+) (ESPERADOS)	0 (0)	3 (1.64)	3 (2.73)	0 (0)	0 (1.64)	6
HEMBRAS (+) (ESPERADOS)	0 (0)	0 (1.36)	2 (2.27)	0 (0)	3 (1.36)	5
TOTAL	0	3	5	0	3	11

Valor teórico de calculado de machos positivos menores de 1 año:

$$(0 \times 6) / 11 = 0$$

Valor teórico de calculado de machos positivos de 1 a 2 años:

$$(3 \times 6) / 11 = 1.64$$

Valor teórico de calculado de machos positivos de 3 a 5 años:

$$(5 \times 6) / 11 = 2.73$$

Valor teórico de calculado de machos positivos de 6 a 8 años:

$$(0 \times 6) / 11 = 0$$

Valor teórico de calculado de machos positivos de 9 a 12 años:

$$(3 \times 6) / 11 = 1.64$$

Valor teórico de calculado de hembras positivas menores de 1 año:

$$(0 \times 5) / 11 = 0$$

Valor teórico de calculado de hembras positivas de 1 a 2 años:

$$(3 \times 5) / 11 = 1.36$$

Valor teórico de calculado de hembras positivas de 3 a 5 años:

$$(5 \times 5) / 11 = 2.27$$

Valor teórico de calculado de hembras positivas de 6 a 8 años:

$$(0 \times 5) / 11 = 0$$

Valor teórico de calculado de hembras positivas de 9 a 12 años:

$$(3 \times 5) / 11 = 1.36$$

$$\text{Chi - cuadrada f 1} = ((0 - 0)^2 / 0) = 0$$

$$\text{Chi - cuadrada f 2} = ((3 - 1.64)^2 / 1.64) = 1.13$$

$$\text{Chi - cuadrada f 3} = ((3 - 2.73)^2 / 2.73) = 0.27$$

$$\text{Chi - cuadrada f 4} = ((0 - 0)^2 / 0) = 0$$

$$\text{Chi - cuadrada f 5} = ((0 - 1.64)^2 / 1.64) = 1.64$$

$$\text{Chi - cuadrada f 6} = ((0 - 0)^2 / 0) = 0$$

$$\text{Chi - cuadrada f 7} = ((0 - 1.36)^2 / 1.36) = 1.36$$

$$\text{Chi - cuadrada f 8} = ((2 - 2.27)^2 / 2.27) = 0.03$$

$$\text{Chi - cuadrada f 9} = ((0 - 0)^2 / 0) = 0$$

$$\text{Chi - cuadrada f 10} = ((3 - 1.36)^2 / 1.36) = \underline{1.98}$$

$$\text{TOTAL} = 6.41$$

$$\text{Chi - cuadrada calculado} = \mathbf{6.41}$$

$$\text{Chi - cuadrada tabla} = \mathbf{5.99}$$

CUADRO A 3

PRUEBA DE CHI – CUADRADA (X^2).

PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI *Neospora caninum* SEGÚN LAS LOCALIDADES Y EDADES DE LOS CANINOS.

	< 1 Año	1 – 2 Años	3 – 5 Años	6 – 8 Años	9 – 12 Años	TOTAL
GANADERIA 1 (ESPERADO)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
GANADERIA 2 (ESPERADO)	0 (0)	0 (0.36)	1 (0.91)	0 (0)	1 (0.55)	2
GANADERIA 3 (ESPERADO)	0 (0)	2 (1.64)	4 (4.1)	0 (0)	2 (2.45)	9
TOTAL	0	2	5	0	3	11

Valor teórico de calculado de ganadería 1 positivos menores de 1 año:

$$(0 \times 2) / 11 = 0$$

Valor teórico de calculado de ganadería 2 positivos de 1 a 2 años:

$$(2 \times 2) / 11 = 0.36$$

Valor teórico de calculado de ganadería 2 positivos de 3 a 5 años:

$$(5 \times 2) / 11 = 0.91$$

Valor teórico de calculado de ganadería 2 positivos de 6 a 8 años:

$$(0 \times 2) / 11 = 0$$

Valor teórico de calculado de ganadería 2 positivos de 9 a 12 años:

$$(3 \times 2) / 11 = 0.55$$

Valor teórico de calculado de ganadería 3 positivos menores de 1 año:

$$(0 \times 9) / 11 = 0$$

Valor teórico de calculado de ganadería 3 positivos de 1 a 2 años:

$$(2 \times 9) / 11 = 1.64$$

Valor teórico de calculado de ganadería 3 positivos de 3 a 5 años:

$$(5 \times 9) / 11 = 4.1$$

Valor teórico de calculado de ganadería 3 positivos de 6 a 8 años:

$$(0 \times 9) / 11 = 0$$

Valor teórico de calculado de ganadería 3 positivos de 9 a 12 años:

$$(3 \times 9) / 11 = 2.45$$

$$\text{Chi - cuadrada f 1} = ((0 - 0)^2 / 0) = 0$$

$$\text{Chi - cuadrada f 2} = ((0 - 0.36)^2 / 0.36) = 0.36$$

$$\text{Chi - cuadrada f 3} = ((1 - 0.91)^2 / 0.91) = 0.0089$$

$$\text{Chi - cuadrada f 4} = ((0 - 0)^2 / 0) = 0$$

$$\text{Chi - cuadrada f 5} = ((1 - 0.55)^2 / 0.55) = 0.37$$

$$\text{Chi - cuadrada f 6} = ((0 - 0)^2 / 0) = 0$$

$$\text{Chi - cuadrada f 7} = ((2 - 1.64)^2 / 1.64) = 0.08$$

$$\text{Chi - cuadrada f 8} = ((4 - 4.1)^2 / 4.1) = 0.0024$$

$$\text{Chi - cuadrada f 9} = ((0 - 0)^2 / 0) = 0$$

$$\text{Chi - cuadrada f 10} = ((2 - 2.45)^2 / 2.45) = \underline{0.082}$$

$$\text{TOTAL} = 0.90$$

Chi - cuadrada calculado = **0.90**

Chi - cuadrada tabla = **5.99**