

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA



“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum* EN VACAS CON PROBLEMAS DE TIPO REPRODUCTIVO, DE PRODUCTORES DE LA COOPERATIVA DE LECHEROS DE SAN JOSÉ PINULA, COOPELAC R.L.”

KHRISTA MARIE POLANCO KEPFER

GUATEMALA, OCTUBRE DEL 2010

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA *Neospora caninum* EN VACAS CON PROBLEMAS DE TIPO REPRODUCTIVO, DE PRODUCTORES DE LA COOPERATIVA DE LECHEROS DE SAN JOSÉ PINULA, COPELAC R.L.”

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

KHRISTA MARIE POLANCO KEPFER

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE:

MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, OCTUBRE DEL 2010

**JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

DECANO: M.V. LEÓNIDAS ÁVILA PALMA
SECRETARIO: M.V. MARCO VINICIO GARCÍA URBINA
VOCAL I: M.V. YERI EDGARDO VÉLIZ PORRAS
VOCAL II: MSc. M.V. FREDY ROLANDO GONZÁLEZ GUERRERO
VOCAL III: M.V. MARIO ANTONIO MOTTA GONZÁLEZ
VOCAL IV: Br. SET LEVI SAMAYOA LÓPEZ
VOCAL V: Br. LUIS ALBERTO VILLEDA LANUZA

ASESORES

M.V. LEÓNIDAS ÁVILA PALMA
M.V. MANUEL EDUARDO RODRÍGUEZ ZEA
M.V. JAIME ROLANDO MÉNDEZ SOSA

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

EN CUMPLIMIENTO CON LO ESTABLECIDO POR LOS ESTATUTOS DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, PRESENTO A SU
CONSIDERACIÓN EL TRABAJO DE TESIS TITULADO:

**DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA NEOSPORA CANINUM EN
VACAS CON PROBLEMAS DE TIPO REPRODUCTIVO, DE PRODUCTORES DE LA COOPERATIVA
DE LECHEROS DE SAN JOSÉ PINULA, COPELAC R.L.**

QUE FUERA APROBADO POR LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMO REQUISITO PREVIO A OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICA VETERINARIA

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo el apoyo brindado durante tantos años, por las enseñanzas y por el amor que siempre me han dado.

A los catedráticos de esta Universidad, por todos los conocimientos ofrecidos y por su cariño y amistad.

A mis asesores, por el tiempo que dedicaron en el proyecto y por todos los conocimientos y consejos para poder llevarlo a cabo.

Al personal del departamento de Microbiología, por la ayuda brindada para correr las pruebas y por el tiempo invertido en ayudarme y explicarme todos los procedimientos a realizar.

Al personal del MAGA, en especial a Aksel Bonilla por su ayuda en la realización de este proyecto.

Al señor Manuel Padilla, que gentilmente donó su tiempo para ayudar a realizar la toma de muestras en las distintas explotaciones y a los productores que me permitieron realizar la toma de muestras en sus animales.

A todos mis amigos por haber colaborado conmigo en la realización de este proyecto y por el apoyo brindado durante tantos años: Silvia Rodríguez, Picho, Paola Arias, Óscar Barillas, Miche, Pedro Reyes, Karla Paredes, Ale Morales, Karenn Bonilla, Waleska López, Marianne Destarac, Álvaro del Valle, Andrés Díaz, Luis Pedro Bermejo...

A Toto por todo su cariño, paciencia y apoyo incondicional durante todos estos años.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	
3.1 General	2
3.2 Específicos	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	
3.1 Historia	3
3.2 Etiología	3
3.3 Clasificación taxonómica	3
3.4 Ciclo de vida	4
3.5 Morfología	5
3.6 Vía de transmisión	
3.6.1 <i>Infección vía oral</i>	6
3.6.2 <i>Vía lactogénica</i>	6
3.6.3 <i>Vía transplacentaria</i>	7
3.7 Epidemiología	7
3.8 Patogenia	8
3.9 Signos Clínicos	9
3.10 Hallazgos de Necropsia	10
3.11 Respuesta Inmune	10
3.12 Diagnóstico	11
3.12.1 <i>ELISA</i>	13
3.13 Control	14
3.14 Vacunación	15

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales

4.1 Recursos humanos	17
4.2 Recursos biológicos	17
4.3 Recursos de campo	17
4.4 Recursos de laboratorio	18

B. Métodos

4.5 Muestreo	18
4.6 Procedimiento	18

4.6.1 ELISA

<i>4.6.1.1 Preparación de las muestras</i>	19
<i>4.6.1.2 Preparación de la solución de lavado</i>	19
<i>4.6.1.3 Procedimiento del test</i>	19
<i>4.6.1.4 Resultados</i>	20
<i>4.6.1.5 Interpretación de los resultados</i>	21

4.7 Análisis de datos	21
-----------------------	----

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados	22
Discusión	26

VI. CONCLUSIONES 28

VII. RECOMENDACIONES 29

VIII. RESUMEN 30

IX. BIBLIOGRAFÍA 31

X. ANEXOS

10.1 Anexo No. 1	34
------------------	----

10.2 Anexo No. 2 36

XI. APÉNDICES

11.1 Apéndice No. 1 37

11.2 Apéndice No. 2 38

I. INTRODUCCIÓN

Neosporosis es la enfermedad producida por el protozoo *Neospora caninum*; es una enfermedad abortigénica de las vacas, tanto lecheras como de carne, que ocasiona grandes pérdidas económicas en las explotaciones. Esta enfermedad fue reconocida por primera vez en perros en 1984, pero se desconocía su agente etiológico. Fue hasta 1988 que se propuso que el agente causal era un protozoario y finalmente se logró aislar *N. caninum* en un cultivo celular.

N. caninum es un parásito similar a *Toxoplasma gondii*. En muchos países es considerada la principal causa de abortos en bovinos, produciendo éstos entre los tres y ocho meses de gestación. *N. caninum* tiene la capacidad de transmitirse de la madre al feto durante varias generaciones, permitiendo así la persistencia de la infección en una población de vacas.

A pesar de la importancia que representa *N. caninum* a nivel mundial, en Guatemala aún no se realizan pruebas diagnósticas, sin embargo en el país se dan muchos problemas reproductivos compatibles con la sintomatología de esta enfermedad, provocando severos impactos a la economía de los productores; esta ausencia de información no permite que se tomen medidas específicas para el control de esta enfermedad. La importancia de este estudio radica en determinar la presencia del parásito en nuestro medio, para así demostrar la necesidad de realizar pruebas diagnósticas de rutina y de esta manera poder controlar el parásito en las explotaciones bovinas.

II. OBJETIVOS

2.1 General

- Contribuir al conocimiento de Neosporosis en vacas lecheras de productores de la cooperativa Coopelac R.L.

2.2 Específicos

- Determinar la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en vacas lecheras con problemas reproductivos de productores de la Cooperativa de Lecheros de San José Pinula, Coopelac R.L., mediante la utilización de la prueba de ELISA.
- Establecer la asociación entre posibles factores de riesgo y la presencia de bovinos reactores positivos a *Neospora caninum*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Historia

La historia de Neosporosis inicia en Noruega en 1984 con un reporte de un caso de encefalitis y miocarditis en caninos producido por un protozoario. En 1988 se le llama *Neospora caninum* y en 1989 se reporta su participación como causa de aborto en bovinos; un año después, se demostró la transmisión transplacentaria en caninos, felinos, bovinos y ovinos. (1,2,3,5,6)

3.2 Etiología

Neospora caninum es un parásito protozoo intracelular de la familia Sarcocystidae, phylum Apicomplexa; se encuentra estrechamente relacionado con *Toxoplasma*. En su ciclo de vida se ven involucrados el perro o el coyote como hospederos definitivos. Entre los hospederos intermediarios se encuentran bovinos, ovinos, caprinos, búfalos de agua y perros. No hay evidencia que este parásito afecte a humanos, pero existe la posibilidad que sea subdiagnosticado como toxoplasmosis. (1,3,4,5,6,11)

3.3 Clasificación Taxonómica

- Reino: Animal
- Sub-Reino: Protozoa
- Phylum: Apicomplexa
- Clase: Sporozoasida
- Subclase: Coccidiasina

- Suborden: Eimeriorina
- Familia: Sarcocystidae
- Género: Neospora (1, 7)

Otros autores sugieren varios tipos de clasificación de acuerdo a su localización, comportamiento, rango de hospederos, ciclo de vida y tipo de reproducción, los cuales son más técnico-científicos por su especificidad. (1)

3.4 Ciclo de Vida

El ciclo de vida se caracteriza por tres estadios infecciosos: Taquizoitos, quistes tisulares y ooquistes. Los taquizoitos y los quistes tisulares se encuentran en los huéspedes intermedios, ubicados intracelularmente. El perro actúa como huésped intermediario y huésped definitivo, desarrollando las fases de reproducción asexual y sexual, luego de haber ingerido los quistes tisulares con bradizoitos. Los perros excretan ooquistes inmaduros en las heces, los cuales pueden esporular después de 24 horas y entonces están listos para infectar a los huéspedes intermedios; aún no se sabe cuánto tiempo sobreviven los ooquistes en el ambiente. El quiste esporulado ingerido por el huésped intermedio se rompe y entonces se liberan los esporozoitos en el tracto intestinal. Estos esporozoitos penetran las células digestivas y se transforman en taquizoitos, los cuales se dividen rápidamente y tienen la capacidad de penetrar y destruir las células. Los taquizoitos invaden todo tipo de células, incluyendo macrófagos y linfocitos, siendo diseminados por todo el cuerpo, con capacidad de infección vertical o transplacentaria, que genera patología fetal y aborto. En esta fase del ciclo los taquizoitos se transforman en bradizoitos. Cuando el hospedador desarrolla una respuesta inmunitaria, los bradizoitos se envuelven en una membrana propia, formando los quistes tisulares, que pueden estar durante años en el huésped sin

causar signos clínicos. Cuando el perro ingiere los quistes tisulares se completa el ciclo. (1,3,6,8)

Puede existir una reactivación de los quistes tisulares, en situaciones donde se comprometa el estado inmunitario del huésped, como ocurre durante la preñez, llevando a una reconversión de bradizoitos en taquizoitos, infectando a la placenta y al feto. (8)

Su ciclo de vida involucra tres fases:

- 1) Fase de multiplicación rápida con formación de taquizoitos, propios de los huéspedes intermedios, de ubicación intracelular, de 3-7 por 1-5 μm . Se localizan con preferencia en células nerviosas.
- 2) Fase de multiplicación lenta con formación de bradizoitos ubicados al interior de un quiste tisular de 100-107 μm de diámetro. Se localizan principalmente en el sistema nervioso central, incluida la retina, y en músculos.
- 3) Fase de eliminación, por parte del hospedero definitivo, de ooquistes de 10-11 μm de diámetro. En condiciones ambientales favorables pueden esporular dentro de 24 horas. (11)

3.5 Morfología

Durante su ciclo de vida presentan las siguientes fases:

- Taquizoitos: Se encuentra en el huésped intermedio en forma intracelular, generalmente a nivel citoplasmático, específicamente en la vacuola parasitófaga de la célula huésped. Puede parasitar un gran número de células como neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, hepatocitos. Son de forma globosa, semilunar u ovoide. Se dividen por endodiogénesis en forma rápida.

- Bradizoitos: Se encuentran dentro de los quistes tisulares. Se dividen por endodiogénesis en forma lenta. Son morfológicamente similares a los taquizoitos.
- Quistes: Se encuentran en el huésped intermedio. Los quistes en tejido son ovalados o redondos y se encuentran principalmente en el sistema nervioso central. Su pared es lisa y gruesa. Dentro de éstos se encuentran los bradizoitos, en número de 50 a 500.
- Ooquistes
 - No esporulados: Son eliminados por perros infectados experimentalmente.
 - Esporulados: Son los ooquistes que después de tres días en el medio ambiente contienen dos esporo-quistes con cuatro esporozoitos cada uno. (1, 6, 8)

3.6 Vía de Transmisión

3.6.1 Infección vía oral

- Los ooquistes eliminados en las heces del hospedero definitivo contaminan praderas, alimentos o agua y los hospederos intermedios adquieren la enfermedad por ingestión.
- Ingestión de quistes tisulares de *Neospora caninum* por caninos. (1, 8, 11)

3.6.2 Vía lactogénica

- Fue inducida en recién nacidos dándoles calostro al cual se le adicionó taquizoitos de *N. caninum*, sin embargo no se ha comprobado que ocurra de forma natural. (1, 6, 8, 11)

3.6.3 Vía transplacentaria

- En los bovinos, una de las principales vías de transmisión y la principal forma a través de la cual la infección se mantiene en un hato durante generaciones es por vía transplacentaria o vertical. La madre infectada transmite la infección al ternero, el cual puede ser abortado entre los 4 y 6 meses, o puede nacer un ternero infectado clínicamente normal o con anomalías nerviosas. (1, 6, 8, 11)

3.7 Epidemiología

Es más probable que se produzca el aborto en vacas seropositivas a *Neospora* que las seronegativas, siendo el riesgo de abortar 3 a 7 veces mayor en las vacas infectadas que en las no infectadas. Una vaca que abortó previamente por *Neospora* tiene menor riesgo de abortar en su siguiente gestación por esta causa, pero este dato puede estar influido por el grado de eliminación selectiva de las vacas que han abortado en un hato. (6, 11)

El aborto puede ser epidémico o endémico. Se considera endémico cuando la tasa de abortos es mayor al 5% anual y que persiste por años; son epidémicos cuando más del 10% de las vacas abortan dentro de 6 a 8 semanas. Aproximadamente el 5% de las vacas de un hato presentan abortos repetidos debido a *Neospora*. (11)

La proporción de bovinos seropositivos aumenta cuando existen perros en las explotaciones, lo cual sugiere su rol de transmisión de la enfermedad. Aún falta determinar cuál es el papel que desempeña el perro en la epidemiología de la Neosporosis bovina, cuál es el período de eliminación de ooquistes y por cuánto

tiempo éstos permanecen infectantes en el medio. El riesgo de aborto asociado a *Neospora* también aumenta cuando existen infecciones concomitantes con otros patógenos, como diarrea viral bovina. (6, 11)

3.8 Patogenia

Después de la ingestión de ooquistes, los esporozitos liberados en la luz intestinal atraviesan la barrera intestinal y llegan a los tejidos a través del sistema linfático y sanguíneo. En las células huésped infectadas, se inicia el proceso de multiplicación mediante endodiogenia pudiendo ocasionar daño celular con necrosis e inflamación, o formar quistes tisulares capaces de persistir durante toda la vida del animal. Luego de esta difusión hematógena, los taquizoitos atraviesan la placenta ocasionando, de acuerdo a la edad de gestación, la muerte del feto o el nacimiento de un ternero congénitamente infectado. (6)

El microorganismo tiene predilección por el epitelio corial fetal y por los vasos sanguíneos de la placenta, causando vasculitis fetal e inflamación y degeneración del corion con necrosis difusa del lecho placentario. Los taquizoitos se introducen en las células del huésped y quedan localizados en una vacuola parasitaria. Se pueden observar en macrófagos, monocitos, células endoteliales vasculares, fibroblastos, hepatocitos, células de los túbulos renales y células cerebrales de los animales infectados. En los casos de afección neuromuscular las neuronas cerebrales y medulares están infectadas. La muerte celular se debe a la multiplicación activa de los taquizoitos. (9)

3.9 Signos Clínicos

El único signo observado en las vacas infectadas es el aborto. Los fetos pueden fallecer intraútero, con reabsorción, maceración o aborto; pueden nacer terneros vivos con enfermedad o ser clínicamente normales pero con infección crónica. El aborto puede ocurrir desde los 3 hasta los 8 meses de gestación, siendo más frecuente entre los 4 y 6 meses. La infección por *N. caninum* adquirida de manera congénita provoca un número sustancial de abortos durante la preñez inicial de vaquillas, pero el riesgo de aborto disminuye en las gestaciones subsecuentes. Se desconoce si *N. caninum* ocasiona pérdidas tempranas de preñez, aunque se ha observado que vacas seropositivas a la enfermedad necesitan mayor dosis de semen para quedar preñadas en comparación con vacas seronegativas. También se ha observado que vacas seropositivas son eliminadas del rebaño a una edad más temprana debido a un bajo desempeño reproductivo. (4, 6, 8, 9, 11)

Las vacas infectadas muestran una disminución en la producción de leche durante la primera lactancia, produciendo aproximadamente un litro menos de leche/vaca/día que las vacas no infectadas, tienen tendencia al aborto y presentan una posibilidad mayor de ser eliminadas del rebaño a una edad menor. (3, 6, 9, 11)

Además del aborto precoz, en las vacas de carne la enfermedad se asocia a partos prematuros de terneras vivas y con bajo peso al nacer. Según el grado de prematuridad, estas terneras pueden mantenerse con vida durante el período neonatal si se aplican medidas intensivas de soporte. (6, 8, 9, 11)

En terneros menores de 2 meses se describen signos como baja de peso o incapacidad para aumentar de peso. Adicionalmente, pueden evidenciarse signos neurológicos como ataxia, disminución del reflejo patelar, pérdida de la propiocepción y flexión o hiperextensión de miembros anteriores y/o posteriores.

En algunos casos puede observarse exoftalmia o asimetría en los ojos. (6, 8, 9, 11)

3.10 Hallazgos de necropsia

La principal alteración macroscópica es la autólisis. El cerebro puede presentar autólisis, pero aún así se debe remitir para estudio junto con el corazón, el hígado y la placenta, siempre que sea posible. Las lesiones histológicas son encefalitis multifocal, miocarditis y hepatitis periportal. (2, 5, 8, 9)

Microscópicamente los tejidos más afectados son: El Sistema Nervioso Central, el miocardio y a nivel de la placenta, donde se produce un proceso inflamatorio agudo con necrosis focal, lo cual afecta la interfase materno-fetal; aunque en ciertas ocasiones, los pulmones, el hígado y los riñones también pueden presentar lesiones. En el cerebro se observan hemorragias multifocales, gliosis multifocal en sustancia gris y blanca, infiltración perivascular de linfocitos y focos de malacia, principalmente en la sustancia blanca. Las lesiones en el sistema nervioso central tienen una distribución al azar, pero se reconocen con mayor facilidad en el tallo del cerebro, debido a que en esta región la autólisis ocurre más lentamente que en el resto del órgano. Las lesiones tempranas consisten en necrosis del tejido nervioso, con o sin hemorragias, difíciles de reconocer en fetos autolizados. (2, 5, 8, 11)

3.11 Respuesta Inmune

En los fetos, el sistema inmune se desarrolla aproximadamente a los cuatro meses de gestación. La capacidad de producir una respuesta inmune mediada por células en el feto bovino, puede existir en los 120 - 160 días de gestación. Durante

el primer trimestre de la gestación el feto es incapaz de reconocer el patógeno, por lo cual es vulnerable a la infección con *N. caninum* y es bastante improbable que sobreviva. En el segundo tercio de la gestación ya es capaz de montar una respuesta inmune rudimentaria, que se evidencia por presencia de anticuerpos en el suero de fetos abortados. Esta respuesta puede no ser suficiente ya que la mayoría de los abortos ocurre en este período. Si la infección ocurre en el último tercio de la gestación, el feto es capaz de sobrevivir y nacer infectado clínicamente sano. (8, 11)

En hembras bovinas congénitamente infectadas decrece el riesgo de aborto en preñeces subsiguientes, sugiriendo cierto grado de protección fetal debido a presencia de una inmunorespuesta materna. Las vacas infectadas persistentemente desarrollan una inmunidad natural protectora contra una segunda exposición a *Neospora*. La principal respuesta inmune protectora contra infecciones de parásitos intracelulares es la respuesta mediada por células, asociada a linfocitos T helper tipo 1, los cuales estimulan la producción de interferón γ (IFN γ), interleuquina 12 (IL-12) e IL-2. En las vacas gestantes se genera una disminución en este tipo de respuesta inmune entre los 4 y 6 meses de gestación, lo cual favorece la multiplicación del parásito y la transmisión vertical en este período. (6, 8, 11)

3.12 Diagnóstico

Para realizar el diagnóstico de *N. caninum* se deben de tomar en cuenta tanto los signos clínicos como los resultados de pruebas diagnósticas; de esta manera se logra hacer un diagnóstico diferencial de: Brucelosis, Campylobacteriosis, IBR y DVB. (8)

En esta enfermedad es necesario distinguir entre la infección clínica y subclínica. El que una vaca sea positiva serológicamente a *Neospora* no necesariamente implica que ésta sea la causa del aborto, sino que sólo es indicativo que ha estado expuesta a *N. caninum*. Solamente el examen histopatológico del feto abortado permite el diagnóstico definitivo de Neosporosis. Para establecer este diagnóstico, se considera una buena evidencia el hallar las lesiones características en el feto y, además, que *N. caninum* sea encontrada en dichas lesiones. (1, 3, 11)

Entre las pruebas de laboratorio que podemos realizar están las siguientes:

- Examen parasitológico: Se utiliza el método de flotación en sacarosa para examinar las heces caninas, determinando así la presencia de ooquistes.
- Aislamiento: Se han realizado aislamientos de *N. caninum* en sistema nervioso central de perros infectados y en fetos bovinos abortados. El aislamiento en cultivos celulares a partir de fetos bovinos 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. Se ha sugerido inocular tejido cerebral de feto bovino a ratones, con la finalidad de multiplicar y concentrar los taquizoitos, aumentando las probabilidades de aislamiento.
- Histopatología: El estudio del feto es una herramienta muy importante, ya que se observan lesiones histopatológicas en corazón, cerebro o músculos. Las lesiones en la corteza cerebral y el cerebelo fetal han resultado las regiones más comúnmente afectadas.
- Pruebas para la detección de anticuerpos:
 - Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFA): Detecta antígenos de membrana. Esta técnica fue el primer test serológico usado para demostrar anticuerpos de *N. caninum*. Es muy sensible y específica para la detección de la infección materna.
 - ELISA: Ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la Neosporosis. Determina la presencia de anticuerpos contra *N.*

caninum en suero, leche u otros fluidos. Permite realizar un gran número de análisis, en un corto tiempo y presenta una alta especificidad y sensibilidad para la detección de infecciones naturales y experimentales.

- Test de aglutinación directa (MAT): El principio de esta prueba es que los taquizoitos intactos tratados en formalina aglutinan en presencia de anticuerpos específicos. Este test es específico y sensible a *N. caninum* y no se producen reacciones cruzadas con otros parásitos.
- Pruebas para la detección de antígenos parasitarios:
 - Inmunohistoquímica: Se realiza en tejidos fijados en formalina con lesiones histopatológicas compatibles con *N. caninum*. Se han utilizado técnicas de inmunohistoquímica con suero anti-*N. caninum* para identificar los taquizoitos en los tejidos, y el cerebro es el órgano en el que se ha conseguido una mayor tasa de detección. Es específica pero poco sensible para el diagnóstico de Neosporosis fetal, por lo que es necesario efectuar también pruebas serológicas en la madre.
 - Prueba de reacción en cadena de la polimerasa: Como ventajas de esta técnica se puede encontrar: Confiabilidad, sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, rapidez, simplicidad y costo. Posee la ventaja que puede realizarse a partir de material congelado.

(1, 3, 6, 8, 9, 11)

3.12.1 ELISA

Cuando el objetivo es realizar estudios seroepidemiológicos usando un gran número de muestras se recomienda más el uso de ELISA, que requiere menos tiempo para su ejecución y es de menor costo. Esta prueba tiene la capacidad de

detectar anticuerpos, pero el inconveniente es que no todo animal que es positivo a la prueba necesariamente abortará o ha abortado por Neospora. Es una ayuda muy importante cuando se analizan los resultados serológicos de varios animales de una finca y se comparan con los obtenidos para otras enfermedades. Otras aplicaciones de esta técnica son la detección de anticuerpos en leche y el ELISA de avidéz de IgG, el cual tiene potencial de discriminar entre infecciones crónicas y recientes. Para diagnóstico en sueros individuales, la inmunofluorescencia indirecta es la mejor opción. (1, 10, 11)

3.13 Control

Siendo el huésped definitivo de la enfermedad un carnívoro, es necesario tomar todas las medidas para excluir la posibilidad de contaminación fecal del alimento del ganado vacuno. Las placentas, los fetos abortados y los terneros muertos deben ser eliminados de manera que ni el ganado vacuno ni los huéspedes definitivos puedan acceder a este material. (6, 8, 9)

Las vacas con infección congénita muestran un riesgo elevado de aborto, y las tasas de aborto en los rebaños infectados se pueden disminuir sustancialmente al eliminar estos animales. Para ello es necesario que la seroprevalencia en el rebaño no sea tan elevada que haga que esta medida sea económicamente inviable. Las terneras con infección congénita se pueden identificar mediante serología en muestras sanguíneas precalostro, siendo eliminadas del rebaño a una edad temprana. Cuando no son posibles las muestras de sangre precalostro, el estudio de las muestras de suero a los 5-6 meses de edad determina las terneras infectadas, de manera que los títulos positivos indican infección congénita o infección posnatal. Es aconsejable realizar al menos 2 sangrados previos al primer servicio de vaquillonas debido al alto riesgo de aborto que tienen por su pobre memoria inmunológica. También se aconseja sangrar a todo animal que

entre al establecimiento, con el fin de identificar animales seropositivos a *N. caninum*. (6, 8, 9)

Es posible que el tratamiento estratégico de las vacas gestantes mediante algún fármaco antiprotozoario pueda eliminar la infección. Esta medida podría ser eficaz en el ganado vacuno de carne, pero no es apropiada en el ganado vacuno de leche en período de lactancia. (9)

Otras medidas de control de la Neosporosis podrían incluir la transferencia de embriones a vacas negativas a *Neospora*, ya que es improbable que este patógeno se transmita por esta vía, debido a que los embriones bovinos con zona pelúcida intacta en estado de preimplantación son resistentes a la invasión de este parásito. De esta manera también se controla la transmisión vertical de la enfermedad. (6, 8, 11)

3.14 Vacunación

Se han utilizado vacunas a partir de taquizoitos inactivados de *N. caninum* en combinación con diferentes adyuvantes, observándose títulos serológicos inferiores respecto a los animales infectados experimentalmente con taquizoitos vivos. Sin embargo, se observó que al utilizar un adyuvante sintético (Polygen), se produjo una respuesta inmune adecuada, similar a la producida por infección natural. (6)

Al utilizar la vacuna atenuada en animales gestantes y desafiados experimentalmente por inoculación endovenosa e intramuscular de taquizoitos vivos de *N. caninum*, ésta no logró prevenir la infección fetal, sin embargo, aunque no evite la transmisión vertical, se ha comprobado su eficacia para evitar el aborto. NeoGuard®, una vacuna atenuada, ha sido aprobada recientemente por el

Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Se ha descrito que esta vacuna es segura para su uso en bovinos preñados sanos. (6, 7)

Los anticuerpos producidos mediante el uso de inmunógenos no pueden ser diferenciados de aquellos producidos en infecciones naturales. Además, existe controversia en cuanto al uso de la vacuna debido a que la eliminación de animales seropositivos ha sido la medida de control sugerida para esta enfermedad. (7)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Materiales

4.1 Recursos Humanos

Para llevar a cabo este proyecto se contó con la colaboración de varias personas, dentro de los recursos humanos utilizados están:

- Tesista.
- Asesores.
- Dueños y trabajadores de las distintas explotaciones visitadas.
- Personal del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad San Carlos de Guatemala.
- Personal del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA).

4.2 Recursos Biológicos

- Suero de 38 vacas con problemas de tipo reproductivo, específicamente aquellos relacionados con el padecimiento de *Neospora caninum* (Aborto, repetición de celo, intervalo entre partos alargado, momificación, nacimiento de terneros débiles o terneros que mueren poco después del nacimiento).

4.3 Recursos de Campo

- Tubos vacutainer
- Capuchón para vacutainer
- Aguja para vacutainer

- Hielera
- Hielo

4.4 Recursos de Laboratorio

- Kit ELISA para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* (IDEXX).
- Equipo de laboratorio para realizar las pruebas ELISA.

B. Métodos

4.5 Muestreo

Se seleccionaron 38 vacas, pertenecientes a productores de la Cooperativa de Lecheros de San José Pinula, Coopelac, R.L., que han presentado problemas de tipo reproductivo, específicamente aquellos relacionados con el padecimiento de *Neospora caninum* (aborto, repetición de celo, intervalo entre partos alargado, momificación, nacimiento de terneros débiles o terneros que mueren poco después del nacimiento). Se determinó que el número de animales a muestrear fuera de 48 en base a la capacidad de la placa de ELISA para *N. caninum*, sin embargo el tamaño de la muestra debió ser modificado a 38 debido a la ausencia de animales disponibles al momento de realizar el estudio.

4.6 Procedimiento

A estos animales se les extrajo una muestra de sangre directamente de la vena yugular, utilizando tubos vacutainer sin anticoagulante. Esta sangre fue

transportada en hielera hacia el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad San Carlos de Guatemala para ser analizada mediante la prueba de ELISA para detectar la presencia de anticuerpos contra *N. caninum*.

4.6.1 ELISA

4.6.1.1 Preparación de las muestras

- Las muestras se diluyeron a una razón de 1:100 con el diluyente para muestra.
- Se registró la posición de cada muestra en la placa y se cambió las puntas de la pipeta con cada muestra. Se mezclaron las muestras antes de dispensar en las placas recubiertas con *Neospora*.

4.6.1.2 Preparación de la solución de lavado

- Cuando el concentrado de lavado alcanzó la temperatura ambiente, el mismo se agitó para asegurar la disolución de las sales que se hubieran precipitado. El concentrado para lavado se diluyó 1:10 con agua destilada/desionizada antes de usarlo.

4.6.1.3 Procedimiento del test

Todos los reactivos alcanzaron la temperatura ambiente antes de usarse. Los reactivos se agitaron suavemente con movimiento circular.

1. Se registró la posición de cada muestra en una hoja de trabajo.
2. Si vertió 100 µl de control negativo en los pozos A1 y A2.
3. Se vertió 100 µl de control positivo en los pozos A3 y A4.
4. Se vertió 100 µl de la muestra diluida en los pozos.
5. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

6. El líquido de todos los pozos se aspiró y se desechó en un recipiente para desechos.
7. Cada pozo se lavó 4 veces con aproximadamente 300 μ l de solución de lavado tamponada con fosfato. El líquido de los pozos se aspiró después de cada lavado. Después de la aspiración de lavado final, se golpeó la placa suave pero firmemente para transferir el líquido residual al material absorbente.
8. Se vertió 100 μ l de conjugado antibovino:HRPO en cada pozo.
9. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Los pasos 6 y 7 se repitieron.
11. Se vertió 100 μ l de solución de substrato TMB en cada pozo de la placa.
12. Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
13. Se vertió 100 μ l de solución de interrupción en cada pozo de la placa para detener la reacción.
14. Haciendo el blanco en el espectrofotómetro con aire se midió y registró la absorbancia a 620 nm, 630 nm y 650 nm.

4.6.1.4 Resultados

- Para que el ensayo fuera válido, la diferencia (P-N) entre el promedio del control positivo y el promedio del control negativo debió ser mayor o igual que 0,150. Además, el promedio del control negativo debió ser mayor o igual que 0,20.
- Si el ensayo no hubiera sido válido, se sospecharía que hubo un error en la técnica y se debería repetir el análisis.
- La presencia o ausencia de anticuerpos contra *Neospora* se determinó al calcular el cociente de muestra con respecto al control positivo (S/P) para cada muestra.

4.6.1.5 Interpretación de los resultados

- Las muestras de suero con cocientes S/P menores que 0,50 se clasificaron como NEGATIVAS hacia los anticuerpos contra Neospora.
- Si el cociente S/P fue mayor o igual que 0,50, las muestras se clasificaron como POSITIVAS hacia los anticuerpos contra Neospora.

En cada una de las explotaciones trabajadas se recabaron datos relevantes para la realización del presente estudio utilizando una boleta de datos elaborada para el efecto (Anexo No. 1). Además se utilizó una boleta individual para cada una de las vacas muestreadas, donde además se anotaron los resultados obtenidos tras la realización de la prueba de ELISA (Anexo No. 2).

4.7 Análisis de datos

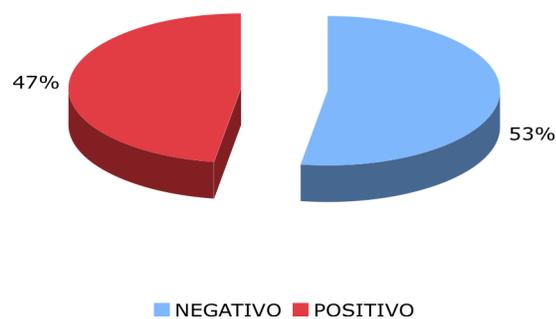
Se procedió a tabular los resultados y éstos fueron analizados y resumidos utilizando estadística descriptiva. Se realizaron pruebas de χ^2 .

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

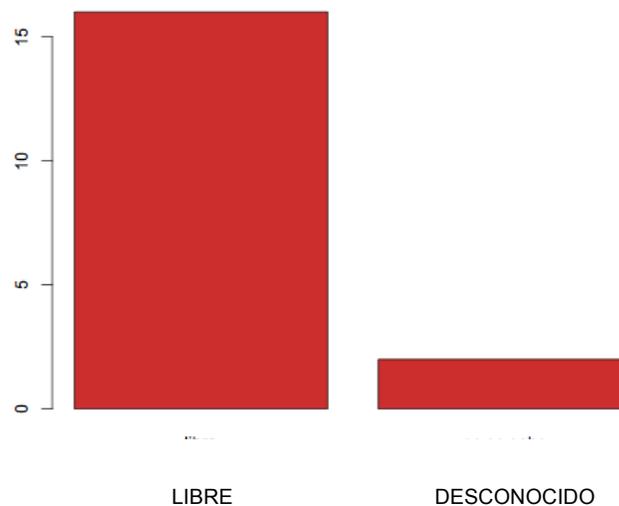
- Tras realizar la prueba de ELISA, se encontró que 18 de las 38 vacas muestreadas (47%) resultaron positivas, es decir presentaron anticuerpos contra *Neospora caninum*.

Gráfica 1. Resultados obtenidos en los animales muestreados.



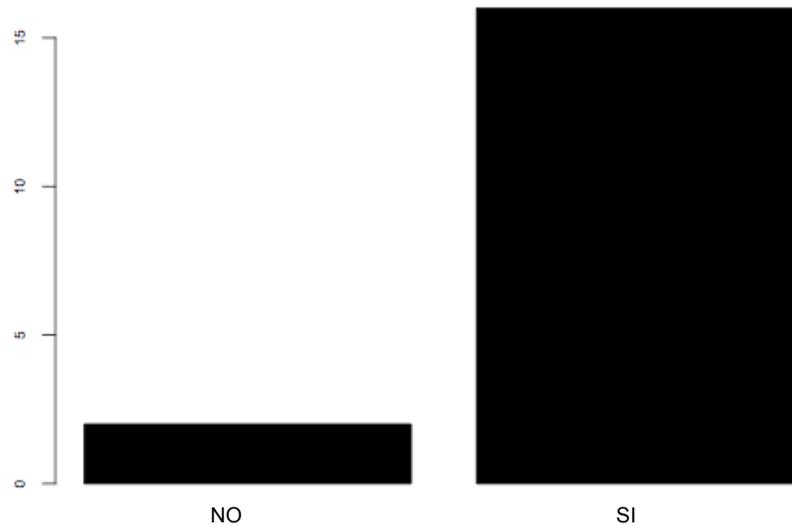
- El 89% de las vacas positivas a Neosporosis (16 vacas) se encuentran libres de Brucella, según estudios realizados por el MAGA en dichas explotaciones; en el 11% restante (2 vacas) el estatus de Brucella es desconocido. Tras la realización de la prueba de Chi², no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos ($p \geq 0.05$).

Gráfica 2. Estatus de Brucelosis en los animales muestreados



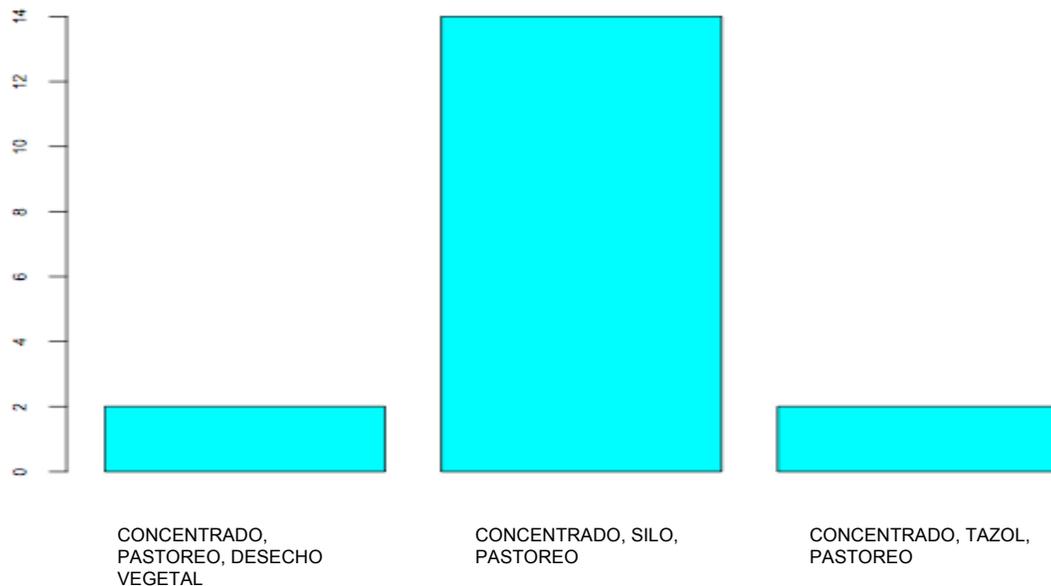
- De las 18 vacas positivas a la enfermedad, 16 de ellas (88%) estaban expuestas a la presencia de perros callejeros en la explotación.

Gráfica 3. Acceso de perros callejeros a las explotaciones con animales positivos a la enfermedad.



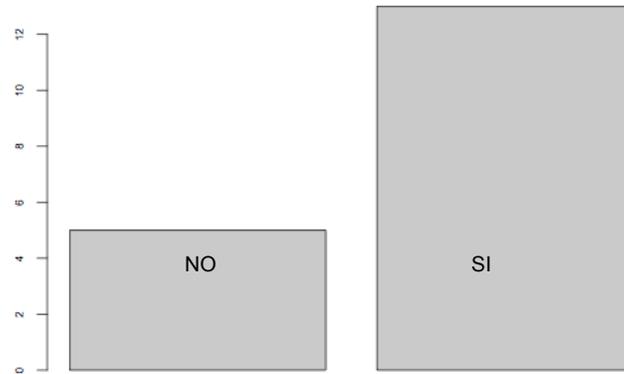
- En cada una de las explotaciones se maneja una dieta diferente para los animales; sin embargo, las 18 vacas que resultaron positivas a la enfermedad, tienen en común, la utilización de concentrado y pastoreo en su dieta.

Gráfica 4. Dieta utilizada en animales con resultados positivos



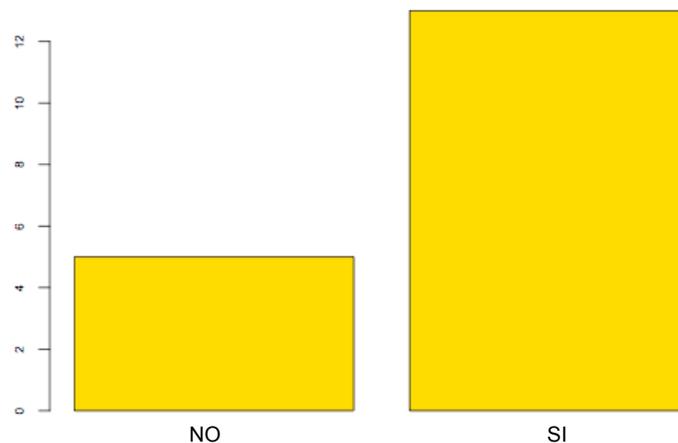
- De las 18 vacas positivas a la enfermedad, 13 de ellas (72%) proceden de explotaciones en las cuales hay presencia de perros acompañantes de vaquería. Tras la realización de la prueba de χ^2 , no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos ($p \geq 0.05$).

Gráfica 5. Presencia de perros propios en las explotaciones con resultados positivos.



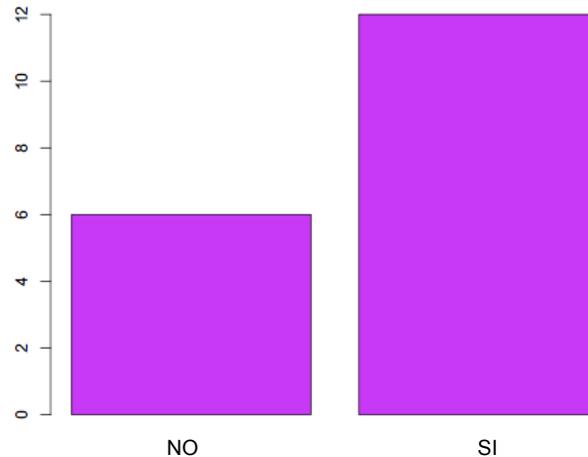
- De las vacas con resultados positivos a anticuerpos contra *N. caninum*, 13 de ellas (72%) proceden de explotaciones donde se ha observado presencia de ratas. Tras la realización de la prueba de χ^2 , no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos ($p \approx 0.05$).

Gráfica 6. Presencia de ratas en las explotaciones con animales positivos a la enfermedad.



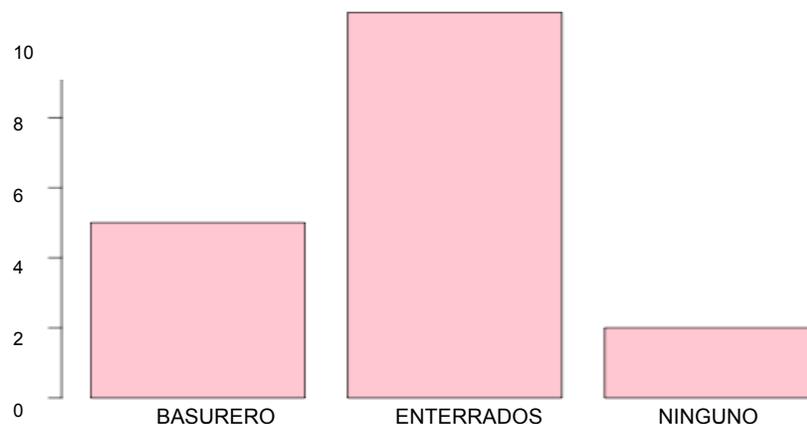
- El 67%, o sea 12 de las 18 vacas positivas a Neosporosis proceden de explotaciones que cuentan con la asesoría de un Médico Veterinario.

Gráfica 7 Presencia de asesoría de un Médico Veterinario en explotaciones con casos positivos.



- 11 (61%) de las 18 vacas positivas a la enfermedad proceden de explotaciones en las cuales los desechos biológicos son enterrados, 5 (28%) de explotaciones donde los desechos son tirados al basurero y 2 (11%) de explotaciones donde no se le da ningún manejo a los desechos biológicos. Tras la realización de la prueba de χ^2 , no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos ($p \geq 0.05$).

Gráfica 8 Manejo de desechos biológicos en las distintas explotaciones en base a los animales positivos a *N. caninum*.



Discusión

- Se han obtenido resultados similares en explotaciones ganaderas en el área de Tecpán, Chimaltenango, en estudios realizados por Salazar¹ y en Patulul, Suchitepéquez, en estudios realizados por Jiménez², haciendo evidente la presencia de la enfermedad en el país.
- A pesar de haber encontrado anticuerpos contra *N. caninum* en vacas que han presentado problemas reproductivos, no podemos aseverar que ésta es la causa de dichos problemas; podemos descartar la Brucelosis como causa en el 89% de los casos, pero aún se deben realizar distintos estudios para determinar la causa específica de tales problemas.
- Diversos estudios reportan al perro como posible fuente de infección de *N. caninum*. En el presente estudio se ha hecho evidente que todas las vacas que resultaron positivas coincidían en poseer entre los ingredientes de su dieta diaria el pasto, a través de pastoreo. En el 88% de los casos positivos a *N. caninum*, perros callejeros o ajenos a la explotación tenían acceso a las pasturas, siendo ésta una posible fuente de contaminación del alimento de las vacas. También se pudo determinar que en el 72% de los casos había perros acompañantes de vaquería presentes, pudiendo ser éstas posibles fuentes de infección. Overall³ describe la importancia epidemiológica de los perros en la transmisión de neosporosis en distintas

¹ Salazar García, SJ. 2010. Determinación de la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum*, por la prueba de ELISA, en vacas con problemas reproductivos, en la Finca “San Vicente”, Tecpán, Guatemala. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. 48 p.

² Jiménez Santizo, DU. 2010. Determinación de la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en bovinos de tipo lechero, en la finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. 38 p.

³ Overall Sarmiento, CR. 2008. Diagnóstico de *Neospora caninum* por medio de flotación fecal en cloruro de sodio (NaCl), y posterior cultivo, en perros acompañantes de vaquería. Tesis Lic. Med. Vet. Guatemala. Universidad San Carlos de Guatemala. 43 p.

ganaderías de Guatemala a través de la contaminación de pasturas con ooquistes de *N. caninum*.

- En la literatura se reporta el manejo inadecuado de los desechos biológicos como un factor de riesgo para esta enfermedad; sin embargo, en este estudio no se pudo comprobar esto, puesto que no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre el manejo de desechos y los resultados obtenidos ($p \geq 0.05$).

VI. CONCLUSIONES

1. Tras la realización de la prueba de ELISA, se hace evidente la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en el área de San José Pinula, Guatemala, en un 47% de los animales muestreados.
2. No se encontró evidencia estadística para determinar factores de riesgo asociados a la enfermedad en los hatos estudiados ($p \geq 0.05$).

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda la realización de muestreos y estudios posteriores para determinar la prevalencia de la enfermedad en los distintos hatos lecheros de San José Pinula, Guatemala.
2. Tras la determinación de la prevalencia de la enfermedad se debe analizar los datos para determinar la fuente de infección, ya sea vertical u horizontal para establecer medidas de control y prevención adecuadas.
3. Es recomendable realizar estudios en perros, tanto propios como en aquellos merodeadores, con el fin de determinar del estatus de la enfermedad en ellos.
4. Se recomienda restringir el acceso de perros a todo tipo de alimento destinado para las vacas, con el fin de evitar la posible contaminación del mismo con ooquistes de *N. caninum*.
5. Se recomienda realizar estudios complementarios para determinar la presencia de otras enfermedades que puedan afectar el desempeño reproductivo de los animales, tales como Diarrea Viral Bovina, Leptospirosis y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina y, de ser necesario, aplicar medidas de control y prevención de las mismas.

VIII. RESUMEN

Se realizó un estudio descriptivo para encontrar la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en explotaciones lecheras de productores de la Cooperativa de Lecheros de San José Pinula, Coopelac, R.L.

Se seleccionaron 38 vacas que hubieran presentado problemas reproductivos compatibles con la sintomatología de Neosporosis. A estas vacas se les extrajo una muestra de sangre en tubos vacutainer sin anticoagulante para ser analizados mediante la prueba ELISA específica para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*.

De las 38 vacas muestreadas, 18 resultaron positivas a la enfermedad, haciendo evidente la presencia de la enfermedad en el área.

No se pudo establecer una relación entre la enfermedad y los distintos factores de riesgo asociados a través de pruebas de Chi^2 realizadas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Aycachi, R. 2005. *Neospora caninum* – Parasitología (en línea). Consultado 28 oct. 2008. Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos30/neospora-caninum/neospora-caninum.shtml>
2. Dubey, JP; Beattie, CP. 1988. *Toxoplasmosis of Animals and Man*. Florida, US. CRC Press. p. 164-171
3. Dubey, JP. et al. 2007. *Epidemiology and Control of Neosporosis and Neospora caninum* (en línea). Consultado 19 sep. 2008. Disponible en <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/20/2/323.pdf>
4. Hafez, ESE; Hafez, B. 2000. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. Trad. G. Féher de la Torre y E. Olvera. 7 ed. México. McGraw-Hill Interamericana. 519p.
5. Long, P. 1990. *Coccidiosis of Man and Domestic Animals*. Boston, US. CRC Press. p. 108
6. Moore, DP. et al. 2001. *Neosporosis bovina: una actualización* (en línea). *Veterinaria Argentina*. Consultado 01 jul. 2008. Disponible en <http://www.portalveterinaria.com/article304.html>
7. Moore, DP. et al. 2005. *Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación* (en línea). *Revista Argentina de Microbiología*. Consultado 26 oct. 2008. Disponible en



http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/sanidad/enf_repro/MooreNeospActualiz2005.pdf

8. Muñoz, A. 2004. Puesta a punto de la técnica en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de *Neospora caninum* en tejido nervioso central de fetos bovinos abortados (en línea). Universidad Católica de Temuco. Chile. Consultado 28 oct. 2008. Disponible en <http://biblioteca.uct.cl/tesis/andrea-munoz/tesis.pdf>
9. Radostits, OM. et al. 2002. Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9 ed. Madrid, ES. McGraw-Hill Interamericana. 2215p.
10. Stites, D. et al. 1997. Medical Immunology. 9 ed. Connecticut, US. Prentice Hall. p. 234
11. Valenzuela, P. 2005. Neosporosis en Bovinos y Caninos (en línea). Universidad de Chile. Consultado 01 sep. 2008. Disponible en <http://www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET1-2005/PDF/Mepavet08.pdf>



X. ANEXOS

10.1 Anexo No. 1**Boleta de datos Finca**

Nombre de la finca _____

¿Cuántas cabezas de ganado tiene? _____

¿Qué tipo de manejo reproductivo utiliza?

Inseminación artificial _____

Monta Natural _____

Ambos _____

¿Cuántos litros de leche produce al día? _____

¿Cuenta con la asesoría de un médico veterinario?

Si _____

No _____

¿Utiliza vacunas? ¿Cuáles? _____

¿Tiene problemas de tipo reproductivo en su hato?

Si _____

No _____

¿Realiza muestreos en busca de Brucelosis?

Si _____

No _____

¿Cuál es el estatus de la finca en cuanto a la presencia de Brucelosis?

¿Qué alimentación reciben sus vacas? _____

¿Dónde almacena el alimento de sus vacas? ¿Hay ratas presentes en este lugar?

¿Otros animales tienen acceso al alimento de las vacas? ¿Cuáles animales?

¿Qué manejo le da a los desechos biológicos? (Fetos abortados, placentas, terneros muertos) _____

¿Tiene perros en su explotación?

Si _____

No _____

¿Pueden acceder a la explotación perros ajenos o callejeros?

Si _____

No _____

Animales a muestrear en busca de Neosporosis: _____

10.2 Anexo No. 2**Boleta de Datos Vacas Individuales**

Identificación del animal (Nombre y/o número) _____

Finca a la que pertenece _____

Raza _____

Edad _____

Número de partos _____

Tipo de problema reproductivo que ha presentado _____

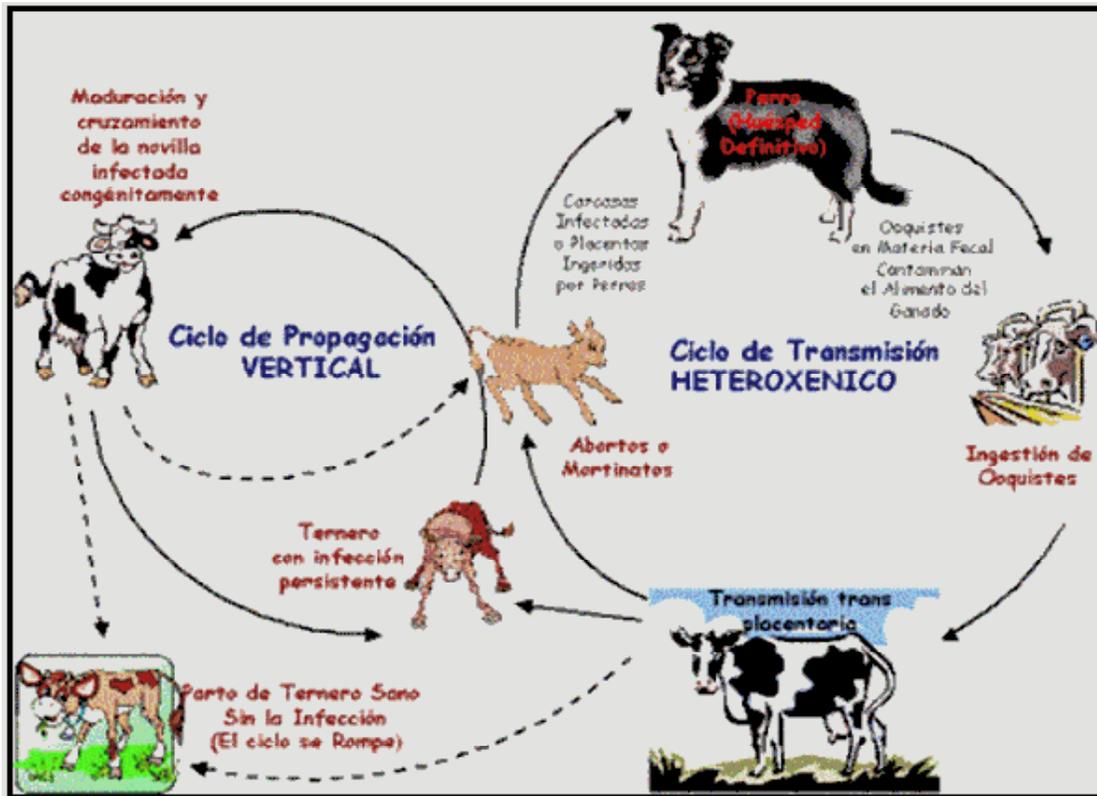
Fecha en que presentó el problema reproductivo _____

Resultado de la prueba ELISA _____

XI. APÉNDICES

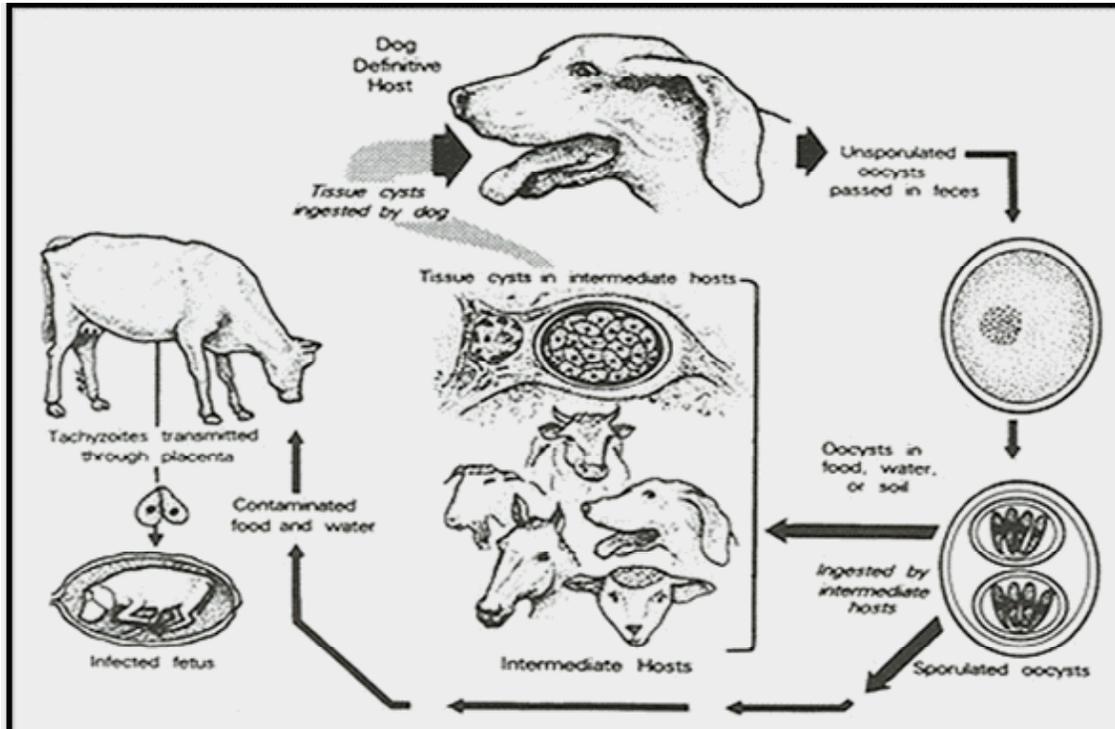
11.1 Apéndice No. 1

Ciclo de vida *N. caninum*



Fuente: 1

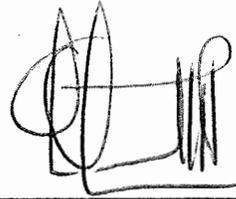
11.2 Apéndice No. 2

Ciclo de Vida *N. caninum*

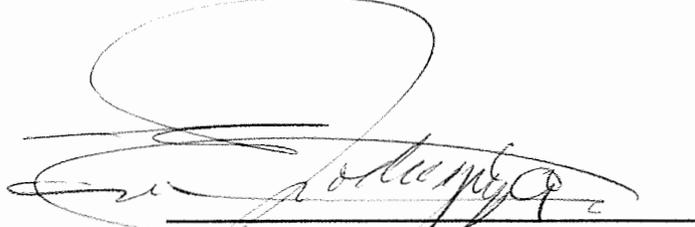
Fuente: 1, 3, 7.

Khrista Marie Polanco Kepfer.
KHRISTA MARIE POLANCO KEPFER

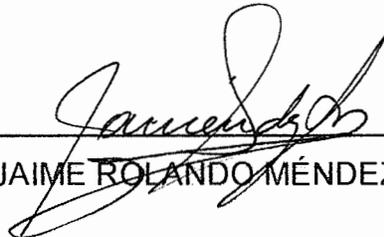
ASESORES



M.V. LEONIDAS ÁVILA PALMA

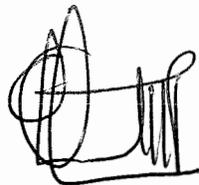


M.V. MANUEL EDUARDO RODRÍGUEZ ZEA



M.V. JAIME ROLANDO MÉNDEZ SOSA

IMPRÍMASE
DECANO



M.V. LEONIDAS ÁVILA PALMA

