



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRIA EN REPRODUCCION ANIMAL

“Efectos de la avidéz de anticuerpos IgG sobre la tasa de transferencia congènita de neospora caninum en vacas lecheras”.

Tesis previa a la obtención del título de Magister en Reproducción animal.

Autor: Dr. Mentor Guillermo Taboada Pico.
CI.1801864339

Director: Dr. Jaime Eduardo Maldonado Rivera.
CL.0103631248

Cuenca - Ecuador

2017



RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue, determinar la tasa de transferencia congénita de *Neospora caninum*, en vacas seropositivas, de acuerdo a la avidéz de los anticuerpos IgG. Se realizó en tres hatos lecheros de las provincias de Azuay y Cañar, de la sierra sur del Ecuador, donde se han reportado abortos y problemas reproductivos. En la cual se seleccionaron 148 vacas lecheras, gestantes en el último tercio de gestación, se determinó su estatus serológico mediante inmunoensayo enzimático ELISA indirecto, en estos animales en los cuales se identificó 40 vacas seropositivas a *Neospora caninum*, formaran parte del estudio. Para determinar la avidéz de los anticuerpos IgG, se modificó el protocolo a cada vaca de las 40 se le realizará otra prueba ELISA, con el protocolo modificado para avidéz. A la sangre de terneros se realizará 2 pruebas ELISA con el protocolo normal de afinidad y avidéz. Esto permitirá conocer el efecto protector de los anticuerpos naturales en el ganado bovino lechero con alta y baja avidéz frente a la transmisión vertical del parásito en las condiciones de producción de la sierra ecuatoriana.

Palabras claves: Avidéz, transmisión congénita, *Neospora caninum*,



ABSTRACT

The objective of this research was: To determine the congenital transfer rate of *Neospora caninum*, in seropositive cows, according to the avidity of the IgG antibodies. It was carried out in three dairy herds in the provinces of Azuay and Cañar, in the southern highlands of Ecuador, Where abortions and reproductive problems have been reported, 148 dairy cows were selected, pregnant in the last third of gestation, Their serological status was determined by indirect ELISA enzyme immunoassay, to obtain the 40 cows positive to *Neospora Caninum*, Which would form part of the study. To determine the avidity of the IgG antibodies, the protocol was modified to each cow of the 40 will be performed another ELISA, With the modified protocol for avidity. To the blood of calves will be carried out 2 ELISA tests with the normal protocol of affinity and avidity. This will allow to know the protective effect of the natural antibodies in dairy cattle with high and low avidity against the vertical transmission of the parasite in the conditions of production of the Ecuadorian sierra.

Key words: Greed, congenital transmission, *Neospora caninum*,



ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INDICE DE GRÁFICOS	6
INDICE DE ANEXOS.....	8
CAPITULO I	12
1.1 INTRODUCCIÓN.....	12
1.2 HIPÓTESIS.....	16
1.3 OBJETIVOS	16
OBJETIVO GENERAL:.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	17
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Neosporosis bovina.....	17
2.2 Historia de la Neosporosis Bovina.....	18
2.3 Etiología.....	18
2.1.3. Situación en el mundo	19
2. 4 Signos clínicos	20
2.5 Epidemiología y ciclo de vida.....	21
2.6 Métodos para el diagnóstico de la neosporosis bovina.....	24
2.7 Respuestas inmunes.....	25
2.8. La avidéz de anticuerpos IgG	26
2.9 La transmisión vertical de la neosporosis a sus crías y la avidéz de anticuerpos. ...	28
2.10 La neosporosis y los abortos de vacas en los tres tercios de gestación.....	28
2.11 La seropositividad.....	32
CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS.....	33
3.1 MATERIALES.....	33
3.1.1. MATERIALES BIOLÓGICOS.....	33
3.1.2. MATERIALES QUÍMICOS.....	33
3.1.3. MATERIALES DE CAMPO Y LABORATORIO.....	34
3.2. MÉTODO	34
3.2.1 LOCALIZACIÓN	34
3.2.2. Metodología.....	35
3.2.2.1 VARIABLES.....	35



OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	35
3.2.3 Diseño experimental y pruebas estadísticas.....	36
3.2.4 Método estadístico	37
Capítulo IV.....	37
4.1. Resultados:	37
4.2 Discusión:.....	46
Capítulo V.....	48
5.1 Conclusiones:	48
5.2 Recomendaciones:	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	54



INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico No1. Aidez de anticuerpos IgG de la madre y transferencia congénita de *Neospora caninum* para la prueba de ELISA de aidez.

Gráfico No2. Aidez de anticuerpos IgG dela madre y estatus serológico de la cría para la prueba de ELISA de aidez.

Gráfico No3. Aidez de anticuerpos IgG dela madre y e historial de abortos para la prueba de ELISA de aidez.

Gráfico No 4 Tasa de transferencia congénita de *Neospora caninum* en vacas con alta aidez de anticuerpos IgG.

Gráfico No 5 Tasa de transferencia congénita de *Neospora caninum* en vacas con alta aidez de anticuerpos IgG.



INDICE DE TABLAS

Tabla No1. Tabla de contingencia para la transferencia congénita de *Neospora caninum* en terneros y avidéz de anticuerpos IgG anti *Neospora caninum* en las vacas.

Tabla No 2. Prueba de Chi cuadrado de Pearson para las variables transferencia congénita de *Neospora caninum* y avidéz de IgG anti *Neospora caninum* en vacas.

Tabla No3 Tabla de contingencia para el estatus serológico de las crías de vacas con alta y baja avidéz de anticuerpos IgG anti *Neospora caninum*.

Tabla No 4. Prueba de Chi cuadrado de Pearson para las variables estatus serológico de las crías y avidéz de anticuerpos IgG anti *Neospora caninum* en las madres.

Tabla No5 Tabla de contingencia para el número de partos de las vacas y la avidéz de sus anticuerpos IgG anti *Neospora caninum*.

Tabla No 6. Prueba de Chi cuadrado de Pearson para las variables número de partos de y avidéz de anticuerpos IgG anti *Neospora caninum* en las madres.



INDICE DE ANEXOS

ANEXOS 1. Transmisión del *Neospora caninum*



CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Mentor Guillermo Taboada Pico en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Efectos de la avidéz de anticuerpos IgG sobre la tasa de transferencia congènita de neospora caninum en vacas lecheras”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca 20 de septiembre del 2017

Mentor Guillermo Taboada Pico

C.I: 1801864339



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Mentor Guillermo Taboada Pico, autor/a del trabajo de titulación “Efectos de la avidéz de anticuerpos IgG sobre la tasa de transferencia congènita de neospora caninum en vacas lecheras”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca 20 de septiembre del 2017

Mentor Guillermo Taboada Pico

C.I: 1801864339



AGRADECIMIENTO

Al Dr. Jaime Maldonado Rivera por su apoyo incondicional que como director de mi tesis me ha brindado todo su tiempo para llevar adelante esta investigación.

A los miembros del Tribunal por sus acertadas sugerencias para dar un mejor realce en este trabajo de tesis.

Quiero expresar un reconocimiento de gratitud a todos los ganaderos que me dieron todas las facilidades para la obtención de las muestras, quedo eternamente agradecido con todos ellos.

Dr. Guillermo Taboada

DEDICATORIA



Dedico este trabajo a mi Dios que me dio la vida, a mis queridos Padres que me supieron guiar por el camino del bien, que fueron mi apoyo incondicional para poder lograr estos objetivos.

A mi esposa y mis dos hijos Brian y Paola que todo el esfuerzo que hago en mi vida es para brindarles lo mejor para ellas.

A mis hermanos y en especial a Juan Taboada quien ha sido el ser que ha sido mi pilar de apoyo hoy y siempre te agradezco de todo corazón, te quiero mucho ñaño.

Dr. Guillermo Taboada

CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

A partir del 1989 se comienza a estudiar la neosporosis bovina como una enfermedad parasitaria emergente. Se considera como una de las principales causas de aborto, subfertilidad, pérdidas tempranas de preñez, momificaciones



fetales, abortos y nacimiento de terneros con ataxia y parálisis en el ganado bovino (Wouda, 1998).

La neosporosis es causada por el protozoo *Neospora caninum*, nombrado así al ser aislado inicialmente de perros, que sufrían trastornos neuromusculares. Este protozoo se descubrió en 1984, pero el primer aislamiento del parásito se produjo en el 1991 por Conrad y colaboradores. El parásito cumple un ciclo que incluye al bovino como hospedador intermediario, al perro y otros canidos como hospedadores definitivos, (Dubey &, Linsay 1996; Maldonado, 2013).

N. caninum es un protozoo Apicomplexa, estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii* y que presenta grandes similitudes en su ciclo biológico y sus modos de transmisión, aunque, *N. caninum* tiene un amplio espectro de hospedadores, (López, 2007).

Según Dubey et, al (2006) y retomado por Rodríguez, en 2015, así como por otros autores, las formas de transmisión, a los bovinos, de este parásito son horizontal y vertical. De forma horizontal por la ingestión de alimento o agua contaminados con los ooquistes expulsados en las heces de perros infectados y de forma vertical, desde la madre infestada hasta su descendencia, durante la gestación.

Cuando la enfermedad se transmite de manera vertical o transplacentaria, existen dos formas para la transmisión materno fetal: infección trasplacentaria endógena, es cuando el parásito enquistado en los tejidos de la madre se activa durante la gestación, debido a mecanismos de inmunosupresión propios de esta etapa, generando una parasitemia que termina con la colonización de tejidos uterinos, placentarios y fetales y la Infección trasplacentaria exógena, que se produce cuando la hembra gestante se infesta y el parásito alcanza la circulación e infecta los tejidos maternos y fetales. (Pérez F.J. 2004).

Concluyen que la principal vía de transmisión en los bovinos es la transplacentaria. (Moore - 2005) Se conoce que producto de esto más del 80% de



las vacas seropositivas transmiten la infección a su cría en la gestación, de transmisión congénita por lo que las hembras infectadas perpetúan el parasitismo de generación en generación, en las explotaciones ganaderas. Dándosele entonces menor importancia a la infección post natal (Barling *et al.*, 2000).

Para diagnosticar la neosporosis bovina se utilizan la inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunohistoquímica (IHQ), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el inmunoensayo enzimático (ELISA). La IFI fue la primera prueba de diagnóstico serológico utilizada, siendo considerada el método estándar para comparación de las otras técnicas posteriormente desarrolladas. Estos métodos de diagnósticos son considerados como adecuados por la Organización mundial de sanidad animal (OIE) (Atkinson *et al.*, 2000).

Fort *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2009, explican que la identificación de anticuerpos a *N. caninum* en un animal es muestra de la exposición al protozoo. Con frecuencia se han desarrollado estudios epidemiológicos al respecto. Asimismo, un animal que tiene títulos de anticuerpos elevados posee mayor riesgo de aborto. Un alta seroprevalencia está asociada con un riesgo más elevado de abortos a nivel del predio (Dubey *et al.*, 2007; Hobson *et al.*, 2005),

Distintos estudios corroboran que la actividad de ciertos grupos celulares, que corresponden a la inmunidad adaptativa de tipo celular, son cruciales en el control la parasitemia y la colonización de tejidos. ¿Los linfocitos Th1 y sus citoquinas IL-1 y ITF-gama? se consideran cruciales para el control del aborto. ¿En estudios realizados en murinos con genes noqueados para IFN-gama? e IL-1, se demostró que estos animales eran incapaces de protegerse frente al reto experimental. Las células Th-1 y sus productos son parte de la cadena de procesos para la formación de inmunidad adaptativa a largo plazo con la formación de anticuerpos específicos Hernandez, J. (2012).

Distintos ensayos donde se han probado inmunógenos preparados con taquizoitos vivos han demostrado niveles aceptables de protección frente al reto experimental,



pero los resultados han sido variables de acuerdo al momento de la inoculación de las vacunas experimentales Hernandez, J. (2012).

Esta enfermedad se presenta de forma variable en todo el mundo, existiendo diferencias dentro del propio país o con respecto a una región geográfica. La neosporosis bovina se caracteriza por ser típicamente asintomática y en los casos en donde se presenta signología clínica la principal manifestación es el aborto, con las consecuentes pérdidas económicas por la reducción en la producción de leche, la muerte de neonatos y la pérdida de animales adultos. No obstante, el riesgo de aborto parece disminuir en las gestaciones siguientes a dicho acontecimiento y solo el 4 a 5% de los animales abortan en más de una ocasión, produciéndose en la mayoría de los casos el nacimiento de terneros congénitamente infectados, (Dubey, 1996; Anderson *et al.*, 1995, Rodríguez, 2015).

La neosporosis es una causa importante del aborto en ganado lecheros en los EE. UU, Nueva Zelanda, y los Países Bajos; Recientemente, la infección de neospora en bovinos se ha reportado en Argentina, Bélgica, Canadá, Dinamarca, Alemania, Hungría, Italia, Japón, México, Nueva Zelanda, España, Suecia, Reino Unido, Estados Unidos y Zimbabwe. De acuerdo con exámenes serológicos, hasta el 100% de ganado en algunos hatos se han expuesto al parásito (Anderson, *et al* 2000; López, 2007).

Un trabajo realizado en la región de la pampa húmeda de Argentina permitió estimar que las pérdidas económicas asociadas al aborto por *N. caninum* en ganado para carne rondarían en más de 12 millones de dólares estadounidenses (Moore *et. al.*, 2013).

N. caninum ha sido asociado a problemas relativos de reproducción en bovinos de las principales regiones ganaderas del mundo (Dubey; Lindsay, 1996). Ocasiona disminuciones económicas importantes, en explotaciones bovinos de carne son considerables (Waldner *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 2013). Sin embargo, no son muy conocidos los factores de riesgo que contribuyen a la exposición a *N. caninum* en este tipo de producción (Sanderson *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2009).



La neosporosis bovina es una enfermedad con alta prevalencia en el ganado bovino lechero del Ecuador alrededor del 40% de las vacas son seropositivas, por tanto, es posible que gran parte de los abortos tengan que ver con esta enfermedad (Moore *et. al.*, 2013).

El control de la neosporosis bovina, se convierte entonces en una actividad compleja, más cuando hasta la fecha, no se ha desarrollado un inmunógeno capaz de evitar el aborto y la transmisión congénita (Losadas 2004).

Distintos trabajos han podido establecer que la avidéz de los anticuerpos IgG puede ser un indicador confiable para la determinación de infecciones recientes o crónicas en neosporosis bovina, (Sager, *et al.*, 2003). En la fisiopatología de la neosporosis bovina es clara la reacción inmunitaria mediada por linfocitos Th1, interferón gamma e interleucina 12, lo que determina una fuerte reacción innata a nivel de los tejidos maternos – fetales y a su vez la generación de una respuesta inmune innata mediada por células de memoria e inmunoglobulina. Este estudio pretende determinar si las vacas con infecciones crónicas cuyos anticuerpos tienen mayor avidéz transmiten la enfermedad a las crías de la misma manera que las vacas con baja avidéz o infecciones recientes. Es posible que la recrudescencia de una infección endógena no termine en la infección fetal crónica debido a una mayor avidéz de los anticuerpos.

1.2 HIPÓTESIS

Una alta avidéz de anticuerpos IgG resulta mayor transmisión congénita frente a una protección a *Neospora caninum*.

1.3 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:



Determinar la tasa de transferencia congénita de *Neospora caninum* en vacas lecheras seropositivas de acuerdo a la avidéz de los anticuerpos IgG.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Determinar la tasa de transferencia congénita de *Neospora caninum*, en relación al número de partos.

2 Historial al número de abortos.

CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Neosporosis bovina.

Moore *et al.*, (2001) aseguran que la neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria abortigénica emergente causada por parásitos protozoarios *N.caninum*. Ha sido descrita en regiones ganaderas de todo el mundo, incluido nuestro país (Mooret *et al.*, 2001). Su ciclo es heteroxeno no totalmente esclarecido afecta principalmente a caninos, bovinos, ovinos, caprinos, equinos y ciervos.



Fue descubierta en 1984 y reconocida como una de las principales causas de aborto en bovinos, (Echaide & Valentini, 1997; Gamón, 2003).

2.2 Historia de la Neosporosis Bovina.

En 1984 cuando Bjerkas, estableció la presencia de un agente diferente a *T. gondi* en cachorros que presentaban alteraciones neuromusculares, a pesar de la signología no se encontró evidencia serológica, lo que evidenció la posibilidad de un agente inmunogenica y antigénicamnete diferente. Dubey en 1988 estudia, tejidos de perros con diagnóstico presuntivo de toxoplasmosis, observando la presencia de un parásito diferente a *T. gondii* al que se denomina *N.caninum*, la infección ha sido identificada en California por estudios retrospectivos en perros desde 1957 y en bovinos desde 1974. En Australia y Nueva Zelanda se afirman que ha estado presente al menos desde 1971 y 1972, (Guamán, 2011)

Más tarde Dubey y col, elaboraron y desarrollaron el diagnóstico por la inmunofluorescencia indirecta siendo la primera prueba para diagnóstico serológico de *N. caninum*. También, Thilsted y Dubey en 1989, consiguieron por primera vez la observación de los parásitos en tejidos cerebrales de fetos bovinos abortados de un rebaño lechero en Nuevo México, (Oviedo. *et al*, 2006).

La neosporosis es estimada como la mayor causa de abortos bovinos en 1991, en el Estado de California. Conrad y col 1993, consiguen reproducir la enfermedad al inocular taquizoitos en bovinos en forma experimental. Bjerkas en 1991 avanzando en lo referente al diagnóstico de la enfermedad determinó que las cepas aisladas en caninos son idénticas a las aisladas en bovinos. Con este hallazgo y el desarrollo de técnicas de diagnóstico inmunohistoquímico y de ELISA se falicitó diagnóstico de esta enfermedad, (Aycachi, 2005).

2.3 Etiología

N. caninum es un protozoo del phylum *Apicomplexa*, familia *Sarcocystidae* cuyo hospedador definitivo es el perro, aunque esta especie puede comportarse también como hospedador intermediario. *N. caninum* es morfológicamente similar



a *T. gondii* y está relacionado a otros protozoos formadores de quistes como *Hammondia* o *Besnoitia*, sin embargo, fue descrito como una especie distinta en 1988. (Dubey *et al.*, 2002; Bjerkas; Dubey, 1991, Rodríguez, A. 2015).

Los estadios parasitarios reconocidos son: taquizoíto, quiste tisular y ooquiste. Mientras los taquizoítos y quistes tisulares se encuentran en hospedadores intermediarios, los ooquistes se eliminan en las heces del perro. Los taquizoítos tienen forma de media luna o globular, miden 3 a 7 μm de largo por 1 a 5 μm de ancho. Los quistes tisulares son redondos u ovals, miden hasta 107 μm , tienen una gruesa pared y contienen estadios parasitarios de lenta replicación, denominados bradizoítos. Ambos, taquizoítos y quistes tisulares son intracelulares, se han observado taquizoítos en distintas células, neuronas, macrófanos miocitos, hepatocitos, epiteliales y renales. Al microscopio electrónico presentan estructuras que permiten la invasión e interacción con el hospedado, micronemas, roptrias y gránulos densos (Manual Merck, Quinta edición, 2000, pg. 1027).

Los quistes tisulares se han observados solamente en el tejido nervioso, salvo en equinos donde se han reportado en el tejido muscular. (Dubey, 1996).

Los ooquistes son esféricos o subesféricos, miden 10 a 11 μm y contienen dos esporocistos con cuatro esporozoítos cada uno (Mc Allister, *et al.*, 1998).

2.1.3. Situación en el mundo

La enfermedad está ampliamente distribuida en el mundo informándose su presencia en África, América, Eurasia y Oceanía, los avances en el conocimiento de esta enfermedad, han sido satisfactorios quedando, por investigarse aspectos relacionados a la prevención y control. También es motivo de investigación la frecuencia natural de la transmisión postnatal en el bovino o existencia de otras especies de hábitos carnívoros, que pudiesen comportarse como hospedadores definitivos de la enfermedad. (Anderson, *et al.*, 1991).



La neosporosis bovina genera grandes pérdidas a la ganadería en todo el mundo es la causante de importantes quebrantos económicos en la industria, contribuye a mermar la eficiencia reproductiva, con un efecto negativo en los índices de rentabilidad de los sistemas de producción animal. El aborto es el efecto patológico directo y es la principal alteración reproductiva inducida por este agente infeccioso (Barr *et al.*, 1997; Corbellini *et al.*, 2005).

En muchos casos las vacas infectadas, presentan abortos sucesivos con un alto riesgo de transmitir en forma vertical la infección a su descendencia, considerándose no aptas reproductivamente lo que merece el reemplazo de animales de alto valor genético y zootécnico por vientres sanos negativos a este parásito (Björkman *et al.*, 1996; Hietala & Thurmond, 1997).

Luego las muertes perinatales, neonatales o embrionarias, la disminución de la producción láctea, el incremento en el tiempo de lactancia, la reducción del valor de los vientres, la disminución en la ganancia de peso y peso de la carcasa, la alta tasa de conversión alimenticia y los costos para diagnóstico forman parte del fuerte impacto económico de la neosporosis bobina en una explotación (Barling *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2001; Haddad *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2005).

2. 4 Signos clínicos

El aborto, es el único signo clínica observada en vacas de cualquier edad y estos se pueden presentar en cualquier estado de preñez, entre el tercer mes y el final de la gestación, en vacas adultas, aunque más frecuentemente ocurre entre el quinto y sexto mes. Se desconoce si *N. caninum* ocasiona pérdidas tempranas de preñez, sin embargo, se ha explicado que mientras vacas seronegativas a la enfermedad, reciben 1.7 dosis inseminantes para quedar preñadas, las vacas seropositivas necesitaron 2.2 dosis de semen. Así mismo, existen evidencias que vacas serorreactoras a *N. caninum* son eliminadas anticipadamente por presentar un bajo desempeño reproductivo, (Gasque, 2008)



Recientemente se describió que tras la presentación de abortos a *N. caninum* en un rodeo de cría, el 22.2% de las vacas seropositivas, con relación 13.5% de sus hijas no se preñaron en el servicio natural. Estos hallazgos sugieren que vacas seropositivas a *N. caninum* podrían resultar en nivel de fertilidad más reducido que el de sus progenitoras. El aborto puede producirse en pocas vacas, pero pueden involucrar hasta el 30% de los animales en el mismo rodeo. Las vacas con anticuerpos a *N. caninum* tienen mayor riesgo de abortar que aquellas seronegativas al parásito. El feto muerto en el útero puede ser reabsorbido, momificarse, o expulsarse con avanzado grado de autólisis. Más comúnmente acontece el nacimiento del ternero clínicamente normal pero crónicamente infectado. (Maldonado, 2013)

Los terneros infectados en el útero pueden tener signos neurológicos y bajo peso al nacimiento. El examen clínico puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar o falta de sensibilidad propioceptiva, sin embargo, son escasos los trabajos que describan esta presentación de la enfermedad en neonatos. Eventualmente pueden presentarse anomalías congénitas como exoftalmia o asimetría ocular. Aunque estos signos van en perjuicio de la salud en los primeros días de vida del ternero, en un estudio, se cita mayor tasa de supervivencia hasta los 90 días de vida en terneros congénitamente infectados debido a la inmunidad cruzada con otros protozoos patógenos que actúan durante este período. En vaquillonas seropositivas a *N. caninum* se ha observado menor producción láctea el momento que han llegado a la producción (1kg/día) durante su primera lactancia. (McAllister *et al.*, 2000; Schares *et al.*, 2002).

2.5 Epidemiología y ciclo de vida.

La enfermedad ha sido informada en Europa, África, Australia, Nueva Zelanda y América. En bovinos, la neosporosis afecta tanto razas para leche como para carne resultando expuestos el 100% de los rodeos. Sin embargo, son escasos los informes de abortos por *Neospora caninum* en rodeos para carne.



La principal vía de contagio en bovinos es transplacentaria de madre a hijo. Experimentalmente esta vía ha sido probada en ovinos, caprinos, ratones, caninos felinos, porcinos y primates. En los bovinos, un bajo porcentaje puede sufrir seroconversión debido probablemente a una exposición postnatal. (Dubey, J. B. 1982).

Ugglá y colaboradores demostraron la infección de terneros adicionando taquizoítos a la leche. Sin embargo, no se ha comprobado la eliminación de estas formas parasitarias a través de la glándula mamaria bovina. En el postparto o tras el aborto, la placenta con presencia de taquizoítos (Shivaprassad *et al.*, 1989) podría servir como fuente de infección para otra vaca que la ingiera. Recientemente un ensayo experimental demostró que dos terneros y dos vacas libres de *N. caninum* mantuvieron dicha condición luego de consumir placentas naturalmente infectadas. (Baillargeon, 2004)

El rol epidemiológico de los toros en la neosporosis bovina es desconocido. (Campero *et al.*, datos no publicados), sin embargo, no se ha establecido la probabilidad de que un toro transmita la enfermedad horizontalmente a una vaca. La inoculación experimental por vía endovenosa de taquizoítos vivos de *Neospora caninum* a tres toros ocasionó el desarrollo de títulos serológicos sin signos clínicos ni lesiones genitales a la palpación luego de dos meses de observación (Campero *et al.*, datos no publicados). En dicho trabajo, no se encontraron anticuerpos a *Neospora caninum* en el plasma seminal, aunque no se evaluó la presencia de este parásito en el semen, (Atoccsa, 2011).

Aunque los ooquistes presentes en las heces de perros infectados pueden ser infectivos a las 24 horas de ser eliminados, la infección oral en terneros sólo se ha descrito en forma experimental. Suponiendo que los ooquistes pueden contaminar el agua y comida de los hospedadores intermediarios, es aún desconocida la frecuencia con que ocurre este hecho en la naturaleza. (Dubey, 1982).



Recientes trabajos han demostrado que la proporción de bovinos seropositivos aumenta cuando existen perros en los establecimientos. En caninos se ha encontrado un incremento de la seroprevalencia relacionada con la edad siendo ineficiente la transmisión vertical en esta especie. Así mismo, la seroprevalencia a *N. caninum* es mayor en caninos pertenecientes a zonas rurales que aquella descrita para perros de áreas urbanas probablemente debido a la estrecha relación epidemiológica existente entre esta especie y los bovinos, (Cordero Del Campillo, 1999).

Un reciente trabajo experimental cuestiona la frecuencia con la cual los perros pueden adquirir la infección en la naturaleza. En dicho trabajo, nueve perros de 2 a 4 años de edad fueron alimentados con fetos bovinos naturalmente infectados con *N. caninum*, sin embargo, los cánidos no eliminaron ooquistes en la materia fecal resultando nula la evidencia clínica, serológica, o histopatológica a *N. caninum*. Evaluando la existencia de taquizoítos de *N. caninum* en placentas de vacas seropositivas que parieron terneros clínicamente normales, se encontró por la técnica de PCR que 2/16 especímenes resultaron positivos. Este hecho demostraría que la infección de perros a partir de placentas procedentes de vacas infectadas es muy baja, (Baillargeon, 2004)

Aunque permanece aún sin conocerse el rol epidemiológico de cánidos salvajes u otros hospedadores, incluidas las aves, existen evidencias de exposición a *N. caninum* natural y experimentalmente en estas especies. (Hernandez, 2012).

El comportamiento epizótico o enzoótico que tiene la enfermedad podría reflejar la transmisión postnatal en bovinos de un rodeo libre o la persistencia de *N. caninum* a través de sucesivas generaciones en forma vertical, respectivamente. La manifestación epizótica de la enfermedad está asociada a la presentación de tormentas de abortos. Sin embargo, se ha sugerido que la infección simultánea con el virus de la diarrea viral bovina (BVD) o la inmunosupresión por la ingestión prolongada de micotoxinas, podrían actuar como factores desencadenantes del aborto a *N. caninum* en un rodeo enzóticamente infectado, (Hincapie, 2005).



En Argentina, el comportamiento epidemiológico de la enfermedad podría tener algunas diferencias en nuestros rodeos para carne y leche debido al diferente tipo de manejo existente. En otras regiones del mundo, recientemente se han descripto ciertos factores de riesgo asociados a la intensificación de los sistemas de producción. Con las condiciones actuales de explotación de nuestro país, dichos factores podrían determinar un comportamiento de la enfermedad en los rodeos locales existiendo mayor cantidad de animales seropositivos en rodeos para leche, (Atoccsa, 2011).

Un reciente trabajo de Moore *et al.*, 2013 reveló que 25/134 (18.6%) vacas vacías o abortadas pertenecientes a 26 rodeos para carne y 251/566 (44.3%) vacas para leche de 47 tambos con similares antecedentes reproductivos, resultaron seropositivas a *N. caninum*. Un estudio seroepidemiológico en 1001 terneros de 6 a 12 meses de edad pertenecientes a 120 establecimientos para carne ubicados en 7 partidos de Corrientes evidenció que la prevalencia a *N. caninum* fue 16.8% y 86 (67.5%) de los rodeos resultaron expuestos.

Otros trabajos, realizados sobre 55 hato para cría pertenecientes a 5 estados ubicados al noroeste de E.E.U.U. revelaron una seroprevalencia del 24% en los 2585 sueros analizados mediante una prueba ELISA de inhibición competitiva presentando todos los rodeos animales seropositivos. Waldner *et al.*, 2010 describe en Canadá una seroprevalencia a *N. caninum* que varió del 16 a 27% en 8 rodeos para carne. Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1999 en España, hallaron una seroprevalencia a *Neospora caninum* del 18% en los 1712 sueros evaluados, resultando positivos 119/ 216 (55.1%) rodeos para carne, (Hernandez, 2012).

2.6 Métodos para el diagnóstico de la neosporosis bovina.

La infección por *N. caninum* puede demostrarse mediante la utilización de pruebas inmunodiagnósticas, por técnicas histopatológicas, moleculares y de aislamiento. Las pruebas inmunodiagnósticas disponibles son la IFI, ELISA, aglutinación



directa, IHQ y electroforesis combinada con inmunodetección (*Western Immunoblot*), (Quintanilla, 1999).

La histopatología y la IHQ realizadas en tejidos bovinos fetales son técnicas diagnósticas relevantes en las infecciones por *N. caninum*. El diagnóstico presuntivo de aborto por *N. caninum* puede emitirse ante la presencia de lesiones como meningoencefalitis necrotizante multifocal (MENM), miocarditis, miositis, nefritis, hepatitis, neumonía y adrenalitis focales no supurativas caracterizadas por la presencia de células mononucleares. La presencia del parásito en dichas lesiones puede confirmarse mediante IHQ realizada sobre tejidos fetales formolados. Aunque su sensibilidad es baja, probablemente debido a los escasos parásitos presentes en tejidos autolizados, resulta una técnica diagnóstica vigente, (Moore, 2001).

Por otro lado, el impacto de la técnica de PCR ha sido notable, permitiendo esclarecer ciertos aspectos epidemiológicos. Debido a la alta eficiencia que tiene *N. caninum* para transmitirse en forma vertical, los resultados positivos por IHQ o PCR deberán estar siempre asociados a problemas reproductivos y utilización de otras técnicas diagnósticas, no sólo para identificar dicho protozoo sino también para descartar otras causas de aborto. El aislamiento de *N. caninum* es difícil y costoso como técnica diagnóstica, sin embargo, se han logrado aislamientos en regiones ganaderas de todo el mundo, (Moore, 2001).

2.7 Respuestas inmunes

En el medio en que viven los animales sucede que los mismos están expuestos a contagiarse reiteradamente, aunque por lo general con dosis bajas; a medida que el hospedador convive con el parásito, desarrolla una inmunidad protectora que lo previene ante las sucesivas infecciones, influyendo así en el número de veces que se infeste, las posibilidades de multiplicación del parásito y consecuentemente en la capacidad de producir daño. La inmunidad protectora, según se ha comprobado



experimentalmente, oscila entre 3 y 9 meses, de la especie y es independiente de la existencia de quistes musculares (Aycachi, 2005, Guamán 2011).

Durante el primer tercio del embarazo el feto es vulnerable a la infección con *N. caninum* y muy probable que no sobreviva, pues no reconoce al patógeno. En el segundo tercio de la gestación, el feto puede montar una respuesta inmune rudimentaria, comprobándose la presencia de anticuerpos en el suero de fetos abortados. En muchos casos esta respuesta puede no ser suficiente y entonces se produce el aborto, por lo que la mayoría de los mismos, son en este tercio del embarazo. Si la infección ocurre en el último tercio de la gestación el feto pudiera ser capaz de sobrevivir y nacer infectado clínicamente sano, (Buxton *et al.*, 2002; Maley *et al.*, 2003).

Contra infecciones de parásitos intracelulares, la respuesta inmune protectora 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 (Anderson *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2005). Esta respuesta inmune disminuye en las vacas gestantes entre los 4 y 6 meses de gestación pues se produce un ambiente inmunológico, lo cual favorecería la multiplicación del parásito y, por lo tanto, también la transmisión vertical en este período (Anderson *et al.*, 2000; McAllister & Latham, 2002).

Moore., *et al*, 2001 considera que una respuesta inmune en hembras bovinas congénitamente infectadas contribuye a disminuir el riesgo de aborto en otras preñeces, indicando cierto grado de protección fetal producto de presencia de una inmunorespuesta materna. Además, destaca que la inmunidad mediada por células (IMC) desempeña un papel fundamental, en infecciones a *N. caninum* por ser este un organismo endocelular. Luego se ha comprobado que las vacas infectadas persistentemente desarrollan una inmunidad natural protectora contra una segunda exposición a neospora (Moore *et al.*, 2005).

2.8. La avidéz de anticuerpos IgG



La presencia de anticuerpos a *N. caninum* en el suero indica que un individuo está infectado por el parásito. A su vez, los anticuerpos pueden persistir por largos períodos de tiempo y presentar fluctuaciones a lo largo del tiempo (Jenkins *et al.*, 1997; Stenlund *et al.*, 1999; Sager *et al.*, 2001).

Avidez es la fuerza de afinidad entre una inmunoglobulina específica y el epítotope de la proteína antigénica del agente infectante, afinidad que aumenta con el tiempo. La avidéz de los anticuerpos fue estimada por primera vez a las tres semanas de la inoculación inicial y a las 6 semanas los valores de avidéz se ubicaron entre el 21% y el 33% en todos los animales en ensayo. Valores altos de avidéz solo pudieron demostrarse a las 8 semanas post-inoculación, de manera que esto podría utilizarse como método para determinar que la respuesta no correspondería a una infección reciente, (Stirrer *et al.* 2000).

Rodríguez, (2015) plantea, que los niveles de anticuerpos o el aumento de los títulos no pueden ser usados para estimar si un individuo sufre de neosporosis aguda o crónica. Midiendo la avidéz que tienen los anticuerpos para unirse con antígenos específicos de *N. caninum*, es una de las formas para la identificación de infecciones recientes. Esta avidéz en su inicio es limitada, pero se aumenta lentamente a medida que avanza las semanas, por lo que se puede distinguir infecciones recientes de infecciones preexistentes, pasadas o viejas, (Rodríguez, 2015).

En diferentes estudios encontraron en vacas preñadas y no preñadas inoculadas con taquizoítos de *N. caninum* un aumento de los índices de avidéz a partir de la segunda semana siguiente a la inoculación, alcanzando valores del 45-47% recién a las 8 semanas de la inoculación. Estos resultados sugieren que una avidéz $\geq 35\%$ puede ser usada para indicar una infección aguda a *N. caninum* (Stirrer *et al.* 2000).

La prueba de avidéz se fundamenta en que el agregado de urea en un porcentaje de 32.5% & 40% durante el desarrollo del ELISA disocia las uniones débiles de los anticuerpos mientras que los anticuerpos con alta avidéz permanecen firmemente



acoplados al antígeno. De esta forma, la prueba permite diferenciar infecciones primarias o recientes (con pobre unión Ag-Ac) de las infecciones preexistentes (con fuertes uniones Ag-Ac). Una comparación de ELISAS de avidéz fue realizada por (Björkman *et al.*, 2006).

Anticuerpos con baja avidéz revelarían una infección reciente y son continuamente encontrados en casos de abortos epidémicos como resultado de una transmisión horizontal. Por otra parte, la alta avidéz en los anticuerpos puede ser detectada en animales que han contraído la infección tiempo atrás. Luego se puede deducir que la alta avidéz de los anticuerpos puede ser producto de una infección transplacentaria como resultado de una transmisión vertical, (Rodríguez, 2015).

2.9 La transmisión vertical de la neosporosis a sus crías y la avidéz de anticuerpos.

Las vacas permanecen infectadas de por vida y transmiten la infección a su descendencia en varias preñeces consecutivas (Figliuolo *et al.*, 2004) o aleatoriamente (Gottstein *et al.*, 2005; Bjorkman *et al.*, 2006; Wapenaar *et al.*, 2006).

Dubey *et al.* (2006), señalaron que, al aumentar el número de partos de las hembras, la proporción de terneros infectados congénitamente disminuye, registrando un 80%, 70%, 67% y 66% en vaquillonas, vacas de segunda parición, de tercera parición y mayores de tercera parición, respectivamente. Además, se ha demostrado que los animales que mostraban títulos altos de anticuerpos durante la gestación o un aumento de los mismos entre los tres y ocho meses de preñez, tenían mayores probabilidades de transmitir congénitamente la neosporosis al feto, en comparación con aquellas madres con bajos niveles de anticuerpos o con niveles decrecientes, (Paré *et al.*, 1996).

2.10 La neosporosis y los abortos de vacas en los tres tercios de gestación.



Para la detección de anticuerpos *N. caninum* El test de ELISA (inmunoensayo enzimático), es ampliamente utilizado porque el procedimiento es rápido, de bajo costo y consistente. La serología en NC se puede utilizar como parte del examen rutinario en caso de aborto, para identificar la tasa de infección del rodeo, establecer una proporción de abortos atribuidos a *N. caninum* y evaluar rutas de transmisión, (Anderson, 2005; Ortega, 2006).

Diferentes estudios han determinado una relación importante entre la presencia de la infección por el *N. caninum* y el aborto, en el ganado bobino, con un riesgo 2 a 3,5 veces superior en las vacas seropositivas que en las seronegativas (Paré et al., 1997; Wouda et al., 1998; Davison et al., 1999; Stenlund et al., 1999). La manifestación epidémica de aborto por neosporosis se ha coligado con una posible exposición a los ooquistes del parásito *N. caninum* En las explotaciones donde se observa defecaciones caninas en zonas de almacenamiento de comida, el consumo de placentas, de fetos abortados o calostro por parte de los perros, fueron propensas a transmisión postnatal (McAllister et al., 2000; Dijkstra et al., 2002).

Se ha determinado con exactitud la diferencia en la producción de citoquinas pre inflamatorias en la gestación temprana con respecto a las fases más avanzadas, lo que se ha relacionado con el mayor número de abortos en el primer tercio de gestación, además la mayor producción de linfocitos Th, (linfocitos ayudantes o colaboradores), es evidente en las primeras 12 semanas de gestación, entonces el aborto dependerá de la carga y tiempo de la infestación parasitaria y de la respuesta, en diferentes estudios sobre la *N. caninum* se ha demostrado que en la mayoría de los casos, la infección experimental con *N. caninum* en vacas sobre los 110 días de gestación produce la muerte de los fetos, también que existen diferencias notables entre las lesiones placentarias y fetales. Además, la producción de inmunoglobulinas fue diferente en los animales muestreados, lo que le llevo a los investigadores a postular que el aborto está determinado por un lado a la carga o grado de infestación parasitaria y por otro a la intensidad de la reacción inmune para controlarla (Almería 2010).



En el tercer trimestre o último tercio de gestación, cuando los elevados niveles de progesterona asociados a la respuesta Th2 son incapaces de controlar la infección por el protozoo, se desarrolla una infección congénita, lo que trae como consecuencia una menor la probabilidad de que ocurra un aborto debido a la maduración del sistema inmune fetal (Iness *et al.*, 2002). Se lograrían terneros congénitamente infectados, las lesiones localizadas en los músculos y en el SNC serían las responsables de los signos neurológicos y neuromusculares observados ocasionalmente (Barr *et al.*, 1991; Bryan *et al.*, 1994). En Tandil argentino, (Barr *et al.*, 1991; Bryan *et al.*, 1994).

Se ha analizado la probabilidad que los abortos dependan en gran medida a la magnitud de la respuesta inmune de la vaca para controlar la infestación, esto fue corroborado al determinarse que existían diferencias en la producción de citoquinas a nivel de los tejidos placentarios en los casos en los que se produjo o no aborto (Rosbottom, 2008).

El riesgo de aborto parece disminuir en las gestaciones siguientes a dicho acontecimiento, solo el 4 a 5% de los animales abortan en más de una ocasión. En la mayoría de los casos se produce el nacimiento de terneros congénitamente infectados. Un animal que tiene títulos de anticuerpos elevados posee mayor riesgo de aborto, (Dubey, 2007; Lindsay, 1996; Anderson *et al.*, 1995).

Hobson *et al.*, (2005), reportan que por cada 1% que se incrementaba la seroprevalencia de *N. caninum* en el rodeo, el riesgo de aborto relacionado a este parásito se incrementaba un 6%.

No ha sido sólida ni significativa las diferencias encontradas en relación a la edad con el riesgo de aborto de los animales. Se ha diagnosticado el *N. caninum* en fetos abortados en animales de diferentes edades. Sin embargo, no se discute que el modo de transmisión del parásito también puede influir en el riesgo de aborto en relación con la edad, (Dubey, Lindsay, 1996).

A partir del año 1985 se comprobó que. *N. caninum* fue la principal causa de aborto en bovinos. Por ejemplo, en el Estado de California, de una muestra de



ganadería mixta, (carne y leche), de 468 abortos el 45,5% fueron causados por *N. caninum*. En el mismo estado entre 1998 y 2003, de una muestra de 2296 abortos, el 44.4% se atribuyeron a neosporosis, sobre otras causas infecciosas como IBR, DVB, Campylobacter, leptospirosis, Arcanobacter y el aborto epizootico bovino. La Universidad de Davis en California presentó un estudio donde se demostró la posibilidad de reproducir experimentalmente la infección fetal por *N. caninum* Causando en la mayoría de los casos la muerte de los fetos infectados, (Maldonado, 2013).

La neosporosis bovina ha ocupado un primer lugar dentro de las causas de abortos en bovinos lecheros en EEUU, se estiman que entre el 5 y el 15% de las preñeces finalizan en aborto y aproximadamente el 33% de estos abortos son producidos por *N. caninum*, (Anderson *et al.*, 1991 y 1995).

Los animales que sufrieron infección posnata, han sufrido en la mayoría de casos, de abortos enzoóticos atribuidos a *N.caninum*, la transmisión vertical no es causante de las denominadas tormentas de abortos. Por tanto, la transmisión transplacentaria sería determinante en la perennación de la enfermedad en el hato, no es su manifestación enzoótica (Thurmond, 1997).

Diferentes estudios han señalado la infección por *N.caninum* como la causa de que las vacas sean entre 3 y 6 veces más proclives al aborto que las vacas negativas, y esto tendría mayor repercusión en las novillas infectadas o congénitament. Las hembras seropositivas con títulos de anticuerpos altos tienen mayor riesgo de abortar con respecto a las positivas que exhibieron títulos más bajos en las pruebas de inmunohistoquímica (Wouda, 1998; Mallaste, 1996).

Wouda y Moen en 1998 realizaron un estudio en hatos que sufrieron temporadas de aborto enzoótico, se hizo seguimiento a la progenie viva en primera y segunda generación filial (F1 y F2), llegando a la conclusión que la seropositividad calostrual hacia que la descendencia sea hasta 3 veces más propensa al aborto, recomendando que los terneros infectados no deberían usarse como material de



reemplazo y así disminuir significativamente el riesgo de aborto en el hato (Wouda , 1998).

Según Campero *et al*, (2000) la IHQ es uno de los métodos directos más utilizado para la detección de *N. caninum* en los fetos. En la práctica se analizan por técnicas inmunohistoquímicas los tejidos fetales que presentan “lesiones compatibles” en el examen histológico con el fin de confirmar la presencia de restos de antígeno, taquizoítos enteros o quistes con bradizoítos. Esta técnica es poco sensible para detectar parásitos en el feto debido a que existen en escaso número en los tejidos infectados y también la demostración de los antígenos de *N. caninum* mediante IHQ depende del número de cortes histológicos realizados y del tiempo invertido en examinarlos (Wouda *et al.*, 1997; Boger & Hattel, 2003). Tandil (argentina)

El test de ELISA (inmunoensayo enzimático), tiene como ventajas que con gran facilidad se puede procesar un gran número de muestras, la obtención de una sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con la IFI, además no hay subjetividad a la hora de emitir un resultado, todo lo que hace confiable esta prueba confiable (Dubey, 2006; Moore, 2001).

2.11 La seropositividad.

La seropositividad es considerada como un factor de riesgo para la presentación de abortos, pero sobre todo frente a los episodios enzoóticos. Se propone que el estado serológico podría usarse para el sacrificio selectivo de vacas y de esta manera reducir el riesgo de aborto en el hato (Moen, 1998).

El riesgo de aborto es mayor cuando el título de anticuerpos es mayor por lo que esto se podría convertir en un indicador de aborto potencial en ganado bovino (Milton, 1996).



En un estudio realizado sobre la determinación de la seropositividad en *N. caninum*, en Venezuela a 2,542 muestras provenientes de 124 explotaciones bovinas doble propósito, distribuidas en cinco municipios (Simón Planas, Urdaneta, Torres, Crespo y Jiménez) del estado Lara, la seropositividad fue detectada mediante ensayo inmunoenzimático ELISA indirecto. La seropositividad (SP) general fue del 17,23.% en el 91,94% de las explotaciones ganaderas se detectaron bovinos positivos a *N. caninum*, con rangos de SP que oscilaron entre 2,78 y 62,5%. Las hembras presentaron un 17,69% de SP y los machos 13,39%, sin diferencias significativas entre ambos grupos. Tampoco se evidenciaron diferencias de SP por grupo etario, con un 20% para los mautes (as), o grupo, 17,06% para los adultos, 15,52% para los novillos (as) y 12,5% para los becerros (os). Esto sugiere que, en los rebaños estudiados, las infecciones por *N. caninum* son predominantemente transmitidas por vía transplacentaria, (Escalona, 2010)

CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS

3.1 MATERIALES

3.1.1. MATERIALES BIOLÓGICOS.

- 40 vacas lecheras seropositivas al *N. caninum*, en el último tercio de gestación
- Muestras de sangre de vacas seropositivas y sus crías antes del consumo del encalostro.
- Suero control positivo.
- Suero control negativo.

3.1.2. MATERIALES QUÍMICOS.



- Kit diagnóstico Neospora ab Hipra España.
- Alcohol antiséptico.
- Termo de transporte.
- Urea 6 MOL

3.1.3. MATERIALES DE CAMPO Y LABORATORIO

- Tubos al vacío para muestras de sangre sin anticoagulante.
- Agujas de toma doble para sistemas de colección de sangre al vacío
- Soporte plástico para sistemas de colección de sangre al vacío.
- Centrifuga (8 puestos).
- Viales para microcentrífuga.
- Lector espectrofotométrico de microplacas de 96 pocillos.

3.2. MÉTODO

3.2.1 LOCALIZACIÓN

La presente investigación se realizó en tres haciendas de la provincia del Azuay y Cañar, donde se han reportado abortos con una altitud entre 2550 y 3264 metros y una temperatura promedio entre 14 – 15 °C Las haciendas fueron: La Esmeralda de Biblián situada a 11 km del cantón Biblián con una temperatura de 14 -15 grados.

La hacienda del Sr. Manuel Quisphi ubicado en la parroquia Octavio Cordero Palacios sector el Roció que se encuentra a 12 Km. De la ciudad de Cuenca con una temperatura de 14°C con una altitud de 2600 m.s.n.m.

La hacienda de la familia Toral que está ubicada en la parroquia de Quingueó a 28 Km. De la ciudad de Cuenca con una temperatura de 16°C.con una altitud de 2550 m.s.n.m.



Las muestras de sangre fueron analizadas en el laboratorio Biomicrovet está ubicado en la calle cantón Paute y avenida de Las Américas en la ciudad de Cuenca.

3.2.2. Metodología

Se realizó un estudio analítico de corte transversal. La variable avidéz de los anticuerpos IgG. (A.A) se identificará con la fuerza de afinidad entre una inmunoglobulina específica y el epítotope de la proteína antigénica del agente infectante, afinidad que aumenta con el tiempo mediante un ELISA indirecto modificado, para determinar avidéz de anticuerpos específicos frente a taquizoítos de *N.caninum*.

3.2.2.1 VARIABLES.

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.

Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores	Escala
Número de partos	Vacas / novillas	Parto el nacimiento de una cría viva	-Primeriza - 2do parto - 3er parto + de 3 partos
Aborto. Terminación de la gestación con feto no viable.	Vacas /novillas	Expulsión o retención de feto o membranas fetales antes del tiempo normal de gestación	Sí No
avidéz de	Vacas /	La fuerza de afinidad	Alta



anticuerpos	novillas	entre una inmunoglobulina específica y el epítipo de la proteína antigénica del agente infectante, afinidad que aumenta con el tiempo	Baja
Transferencia congénita de <i>N. caninum</i>	Vacas a terneros	La presencia de <i>N. Caninum</i> en las crías inmediatamente del nacimiento antes de consumir calostro.	Positivo negativo

3.2.3 Diseño experimental y pruebas estadísticas

Para esta investigación se utilizó el método de campo, las muestras de 10 ml, de sangre fueron obtenidas de las 148 vacas, seleccionadas al azar en las tres estancias lechera. Las muestras se extrajeron de la vena coxígea. Luego se colocaron en tubos de ensayo sin anticoagulante correctamente identificadas para ser trasladadas a Biomicrovet para su procesamiento. Conforme se fueron obteniendo, se registraron en una ficha con los siguientes datos: nombre del propietario de la estancia, nombre y ubicación, fecha y número de muestra.

Se realizará un muestreo dirigido a vacas en el último tercio de gestación seropositivas a anticuerpos de *N.caninum* y a las crías inmediatamente después del parto antes de tomar el calostro.

Método laboratorio: en el laboratorio las muestras fueron centrifugadas para separar el suero del coágulo sanguíneo. El análisis se realizó por medio de inmunoensayo enzimático ELISA. A cada vaca se le realizará 2 pruebas ELISA,



una con el protocolo normal de afinidad y otra con el protocolo modificado para avidéz. A las crías se le tomarán muestras de 5 ml de sangre de la vena yugular. A la sangre de terneros se realizará 2 pruebas ELISA con el protocolo normal de afinidad y avidéz, se aplican las mismas pruebas.

3.2.4 Método estadístico

Se utilizó la prueba de Chi Cuadrado y análisis de varianza, a fin de analizar los resultados según las variables tomadas en cuenta en este estudio.

Capítulo IV

4.1. Resultados:

A partir de las pruebas aplicadas se obtuvieron a los siguientes resultados:

Tabla No1. Tabla de contingencia para la transferencia congénita de *N. caninum* en terneros y avidéz de anticuerpos IgG anti *N. caninum* en las vacas.

Tabla cruzada transferencia congénita*Avidéz de IgG					
			Avidéz de IgG		Total
			Baja avidéz	Alta avidéz	
Transferencia congénita	No	Recuento	2	21	23
		Recuento esperado	2,6	20,4	23,0
	Si	Recuento	2	11	13
		Recuento esperado	1,4	11,6	13,0
Total		Recuento	4	32	36
		Recuento esperado	4,0	32,0	36,0



Tabla No 2. Prueba de Chi cuadrado de Pearson para las variables transferencia congénita de *N. caninum* y avidéz de IgG anti *N. caninum* en vacas.

Pruebas de chi-cuadrado					
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)	Significación exacta (bilateral)	Significación exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,376 ^a	1	0,540		
Razón de verosimilitud	0,363	1	0,547		
Prueba exacta de Fisher				0,609	0,459
Asociación lineal por lineal	0,366	1	0,545		
N de casos válidos	36				

a. 2 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 1,44.

El valor de p 0,540 es mayor al valor de alfa 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis alternativa, por tanto, la avidéz de los anticuerpos IgG de las madres no está estadísticamente asociada con la transferencia congénita de *N. caninum*. Según el criterio de Cochland los resultados de X^2 deben interpretarse con cautela cuando los valores esperados menores a 5 superan el 20% de las celdas.

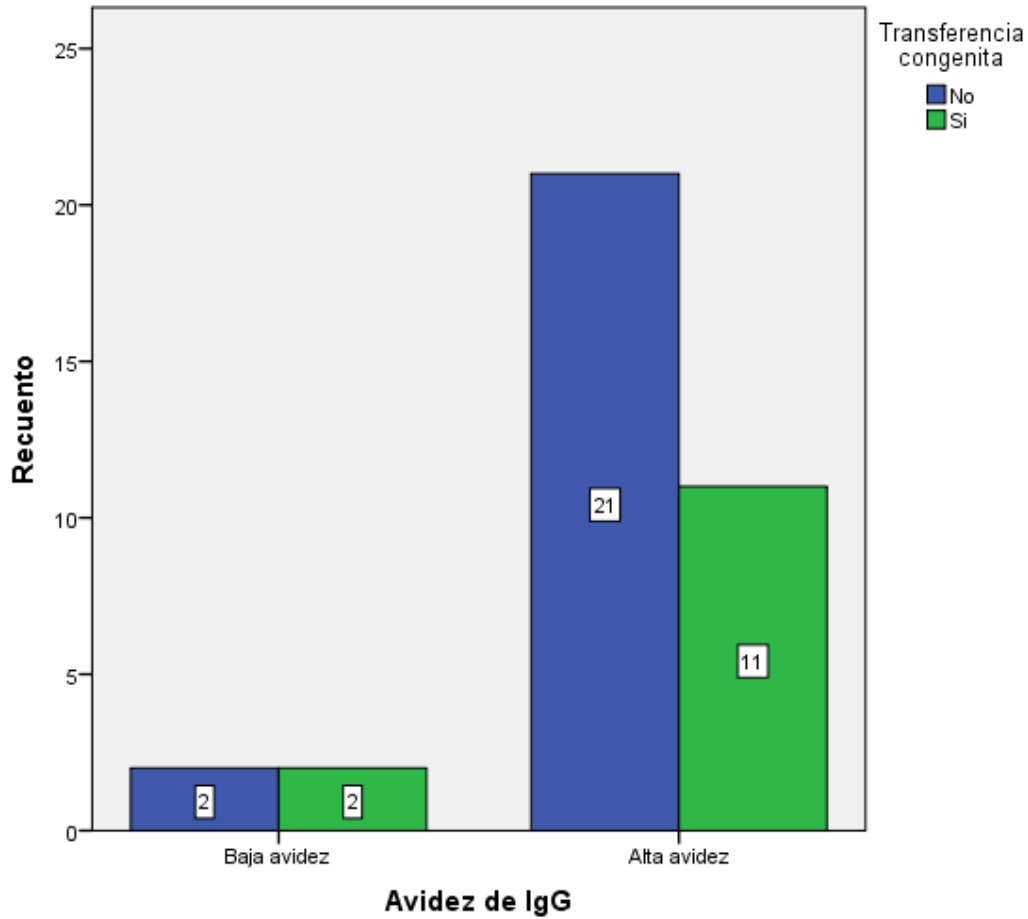


Grafico N1. Avidéz de anticuerpos IgG de la madre y trasferecia congénita de *N. caninum* para la prueba de ELISA de avidéz.

Tabla cruzada categorías según el número de partos* Avidéz de IgG					
			Avidéz de IgG		Total
			Baja avidéz	Alta avidéz	
Categorías según el número de partos	De 0-2 partos	Recuento	3	13	16
		Recuento esperado	1,8	14,2	16,0
	De 3-4 partos	Recuento	1	18	19



		Recuento esperado	2,1	16,9	19,0
	5 o más partos	Recuento	0	1	1
		Recuento esperado	0,1	0,9	1,0
Total		Recuento	4	32	36
		Recuento esperado	4,0	32,0	36,0

Tabla No3 Tabla de contingencia para el estatus serológico de las crías de vacas con alta y baja avidez de anticuerpos IgG anti *N. caninum*.

Tabla cruzada estatus serológico de la cría*Avidez de IgG					
			Avidez de IgG		Total
			Baja avidez	Alta avidez	
Estatus Serológico de la cría	Negativo	Recuento	2	21	23
		Recuento esperado	2,6	20,4	23,0
		% dentro de avidez de IgG	50,0%	65,6%	63,9%
	Positivo	Recuento	1	6	7
		Recuento esperado	0,8	6,2	7,0
		% dentro de avidez de IgG	25,0%	18,8%	19,4%
	Sospechoso	Recuento	1	5	6
		Recuento esperado	0,7	5,3	6,0
		% dentro de avidez de IgG	25,0%	15,6%	16,7%
Total		Recuento	4	32	36
		Recuento esperado	4,0	32,0	36,0
		% dentro de avidez de IgG	100,0%	100,0%	100,0%

Tabla No 4. Prueba de Chi cuadrado de Pearson para las variables estatus serológico de las crías y avidez de anticuerpos IgG anti *N.caninum* en las madres.

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	0,395 ^a	2	0,821
Razón de verosimilitud	0,377	2	0,828
Asociación lineal por lineal	0,371	1	0,543

N de casos válidos	36	
a. 3 casillas (50,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,67.		

El valor de p 0,821 es mayor al valor de alfa 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis alternativa, por tanto, la avidéz de los anticuerpos IgG de las madres no está estadísticamente asociada al estatus serológico de las crías.

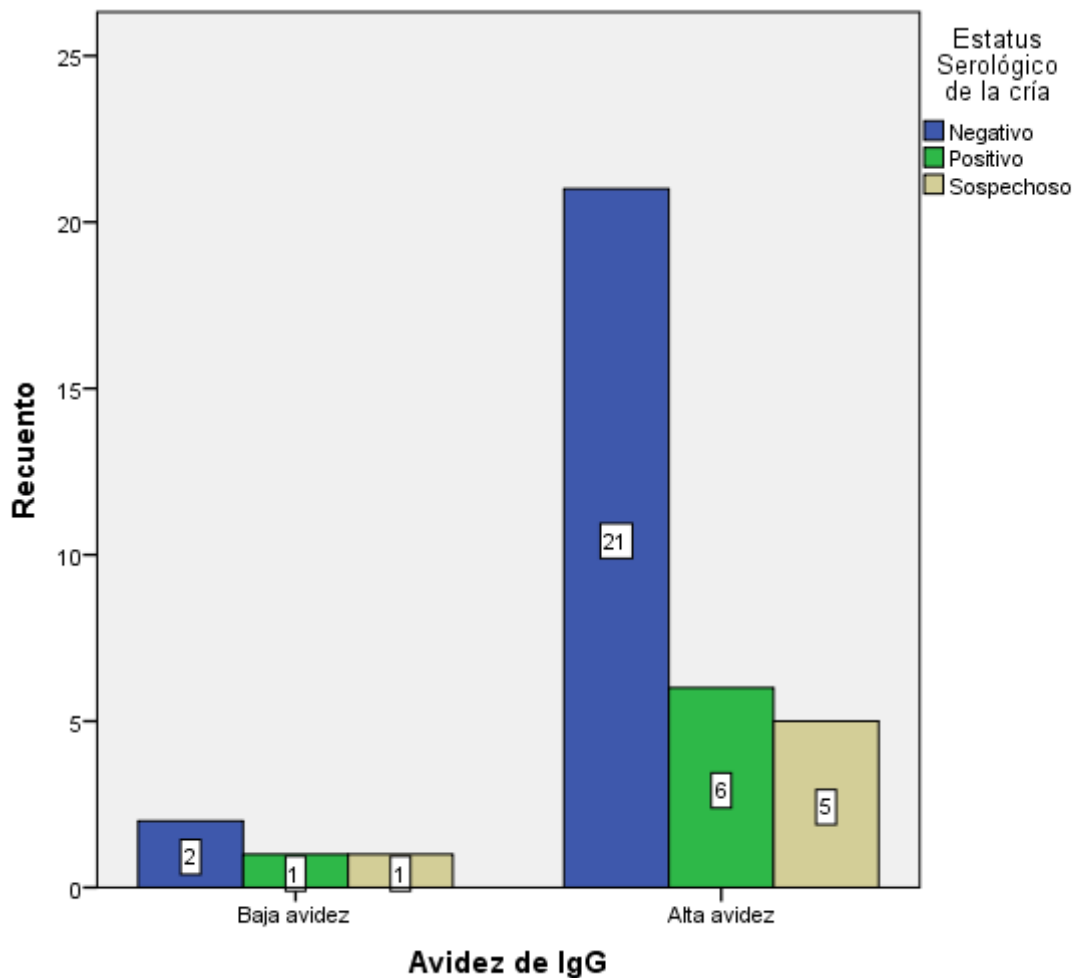




Grafico No2. Aidez de anticuerpos IgG dela madre y estatus serológico de la cría para la prueba de ELISA de aidez

Tabla No5 Tabla de contingencia para el número de partos de las vacas y la aidez de sus anticuerpos IgG anti *N. caninum*.

Tabla cruzada Categorías según el número de partos*Aidez de IgG					
			Aidez de IgG		Total
			Baja aidez	Alta aidez	
Categorías según el número de partos	De 0-2 partos	Recuento	3	13	16
		Recuento esperado	1,8	14,2	16,0
	De 3-4 partos	Recuento	1	18	19
		Recuento esperado	2,1	16,9	19,0
	5 o más partos	Recuento	0	1	1
		Recuento esperado	0,1	0,9	1,0
Total	Recuento	4	32	36	
	Recuento esperado	4,0	32,0	36,0	

Tabla No 6. Prueba de Chi cuadrado de Pearson para las variables número de partos de y aidez de anticuerpos IgG anti *N. caninum* en las madres.

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	df	Significación asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,728 ^a	2	0,421
Razón de verosimilitud	1,838	2	0,399
Asociación lineal por lineal	1,628	1	0,202
N de casos válidos	36		



a. 4 casillas (66,7%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es ,11.

El valor de p 0,421 es mayor al valor de alfa 0,05 por lo que se rechaza la hipótesis alternativa, por tanto, la avidéz de los anticuerpos IgG de las madres no está estadísticamente asociada al número de partos.

(Tasa de transferencia congénita según la avidéz de anticuerpos IgG anti *N. caninum*)

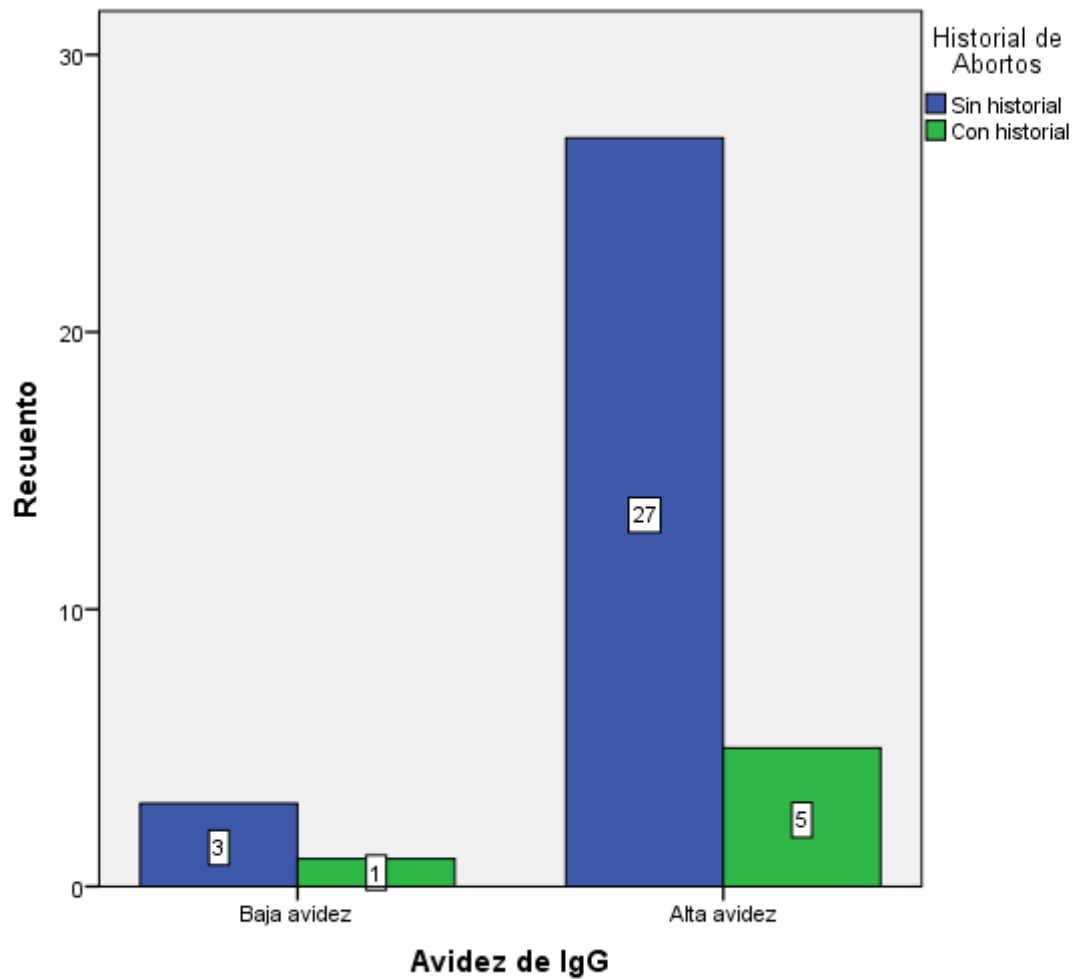


Grafico No3. Avidéz de anticuerpos IgG dela madre y e historial de abortos para la prueba de ELISA y avidéz

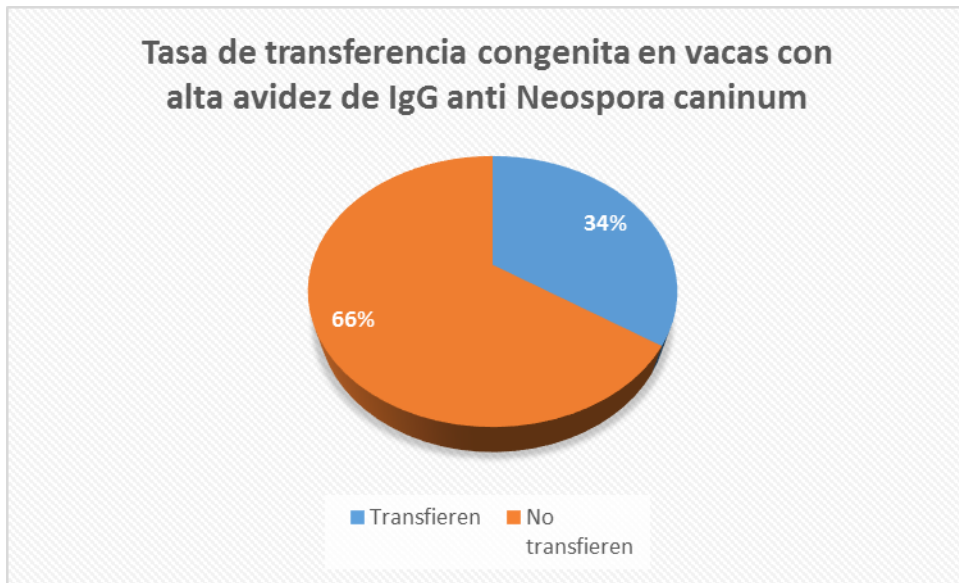
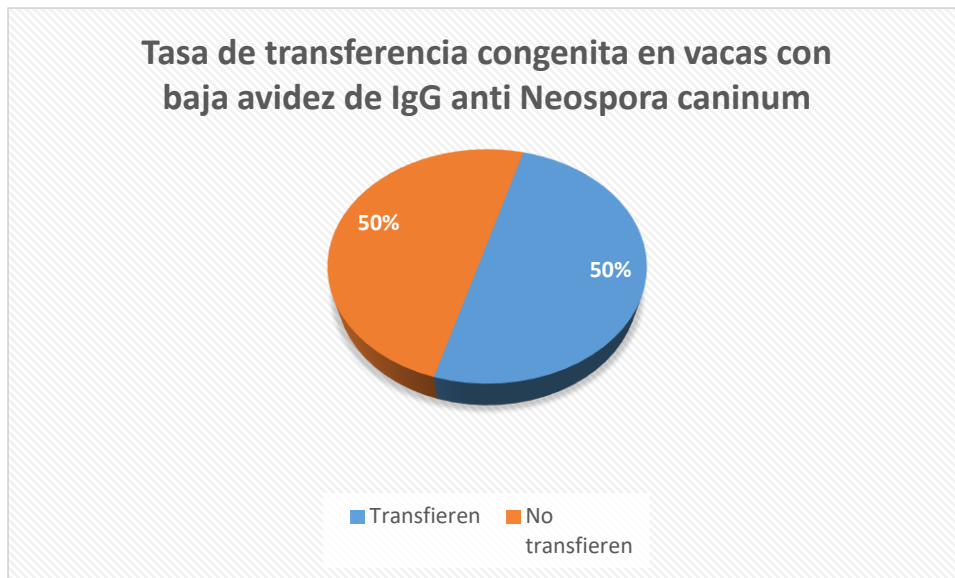


Gráfico No 4 Tasa de transferencia congénita de *N. caninum* en vacas con alta avidéz de anticuerpos IgG.

Gráfico No 5 Tasa de transferencia congénita de *N. caninum* en vacas con alta avidéz de anticuerpos IgG.



4.2 Discusión:

En nuestro trabajo la avidéz de anticuerpos IgG anti *N. caninum* de las vacas no se asoció estadísticamente con la transferencia congénita de *N. caninum*. Por tanto,



las vacas infectadas natural y crónicamente tendrían la misma probabilidad de transmitir la enfermedad a las crías que las vacas con infecciones recientes.

En este estudio las vacas con alta y baja avidéz transmitieron la enfermedad a sus crías, la gran mayoría de vacas con alta avidéz no transmitieron la enfermedad, la diferencia numérica es considerable, pero es posible que se deba a la distribución en la muestra, donde la mayoría de los animales tenían alta avidéz. Tuvimos pocos animales de baja avidéz en donde el 50% transmitió la enfermedad.

En varios estudios se relaciona a la baja avidéz con abortos en el contexto de la transmisión horizontal de las llamadas tormentas de abortos (Björkman, *et al.* (2005), Basso, *et al.* 2010), no existe información concluyente donde se demuestre que en las vacas con enfermedad crónica la transmisión congénita se reduzca. Nuestro trabajo ha evidenciado diferencias en la tasa de transferencia congénita entre vacas de baja y alta avidéz, esto se esperaría de acuerdo a lo observado en estudios epidemiológicos de corte longitudinal donde se reduce la prevalencia considerablemente en relación a los primeros muestreos y donde también aumento la avidéz (Frössling, *et al.* 2005). Aunque para otros autores el estatus seropositivo es algo muy estable en el tiempo y la mayoría de abortos se producen en vacas seropositivas y con historial de abortos (Pabón, *et al.* 2007). En nuestro estudio el historial de abortos no se relacionó con la avidéz o la cronicidad de la infección.

El test de ELISA de avidéz al parecer no es tan robusto como el ELISA tradicional debido posiblemente a la escasa comprensión de los epítomos relacionados con la afinidad a su parátipe, esto fue evidenciado en un estudio que comparó los resultados del test en distintos laboratorios europeos, donde se observó diferencias en la interpretación de la avidéz, principalmente por el punto de corte usado para el cálculo. En nuestro trabajo el punto de corte fue similar al de Ortega-Mora y colaboradores, ya que adaptamos el mismo kit comercial de Hipra-España (Björkman, *et al.* 2006).



Capítulo V

5.1 Conclusiones:



- La aivez de anticuerpos IgG anti *N.caninum* (infecciones crónicas) no se relaciona con la transferencia congénita de la enfermedad.
- El historial de aborto de las vacas no se relaciona con la aivez de los anticuerpos IgG anti *N. caninum* ni con la trasferencia congénita.
- La mayoría del ganado en la muestra en estudio tiene infección crónica de *N.caninum*

5.2 Recomendaciones:

- Para mejorar la comprensión del papel de la inmunidad adquirida mediada por anticuerpos es necesario realizar estudios controlados con individuos crónica y agudamente infectados que permitan valorar la transmisión congénita, ya que la aivez de anticuerpos podría ser un indicador del grado de protección de un individuo natural o experimentalmente infectado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, (1995) Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J Am Vet Med Assoc 207: v.x2, 1206-1210

Anderson, M., Barr, B., & Conrad, P. (1991). Bovine Protozoal Abortions.

Anderson, M.L. Adrianarivo, A.G.; Conrad P.A.2000. Neosporosis in cattle. Animal Reproduction Science, 60: 417- 431

Atkinson, r., harper, p.a.w., reichel, m.p., ellis, j.t. 2000. Progress in the serodiagnosis of *N. caninum* Infections of Cattle. Parasitol Today. 16,3 pág.

Atoccsa, J. (2011). Seroprevalencia de Neospora canis en Bovinos LecherosCriados al Pastoreo. Argentina: Melgar,Revista.

Aycachi R. *N. caninum* – Parasitología. Agosto 2005. (Internet). Disponible:

Baillargeon, J. (2004). Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the international embryo transfer society as a method of controlling vertical transmission of neospora caninum in cattle. j.am.vet.med.assoc. Estados Unidos: Assoc. v.10, n.3, pág.168-173

Barling KS, McNeil JW, Thompson JA, et al. (2000) Association of serologic status for *N. caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. J Am Vet Med Assoc 217: v,2, 1356-1360 pág.

Barling, K. (2000). Association of serologic status for *N. caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. JAVMA. 217 (9): 1356-1360.

Barr, B. 1997. Neosporosis report of the international neospora. Workshop. Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 19(4): 120-144.

Basso, W., et al. (2010). "Microsatellite typing and avidity analysis suggest a common source of infection in herds with epidemic *N. caninum*-associated bovine abortion." Veterinary Parasitology **173**(1–2): 24-31.

Bjerkas, I., and Dubey, P., Evidence that *N. caninum* is identical to the Toxoplasma like parasite of norwegian dogs. Acta vet Scan n,32: 407. 1991.



Björkman, 1996 Neospora species infection in a herd of dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 208(9): 144-146.

Björkman, C., (2006). "*N. caninum* IgG avidity tests: An interlaboratory comparison." Veterinary Parasitology **140**(3–4): 273-280.

Björkman, C., et al. (2005). "IgG avidity pattern in cattle after ingestion of *N. caninum* oocysts." Veterinary Parasitology **128**(3–4): 195-200.

Corbellini, L. 2005. Diagnostic survey of bovine abortion with special reference to *N. caninum* infection: Importance, repeated abortion and concurrent infection in aborted fetuses in Southern Brazil. The Veterinary Journal. 172: 114-120.

Cordero del Campillo M, Rojo F, Martínez A, Sánchez C, Hernández S, Navarrete I, Parasitología Veterinaria: Parte III: Cap. 21: Parasitosis del sistema reproductor. 1ª Edición. Madrid: McGrawHill – Interoamericana.1999. Pág. 330 - 332.

Dubey J.P., Schares G., Ortega-Mora L.M. (2007). Epidemiology and control of neosporosis and *N. caninum*. Clin Microbiol Rev. 20: 323-367

Dubey J.P. (1996) Serologic responses of cattle and other animals infected with *N. caninum*. Am J Vet Res. 57: 329-336.

Dubey JP, Linsay DS (1996). A review of *N. caninum* and neosporosis Vet. Parasitol 67(2): 1-59. Pág 8 documento consulta de la carpeta

Dubey, J. B. (1982). Sarcocystis as a cause of placentitis and abortion in cattle. Vet. Pathol. citado por 37 artículos 19(3):315-8 pág. Estados Unidos.

Dubey, J.P., (2002). *N. caninum* and Hammondia heydorni are separate species/organisms. Trends Parasitol. 18: 66-69.

Dubey, J.P., D.S. 1996. A review of *N. caninum* and neosporosis. Vet Parasitol. 67: 1-59. Avidez



Dubey, (2006). Diagnosis of bovine neosporosis. Science Direct. Retrieved from Sciences Direct website:

Ford, M. *N. caninum*: "Estudio seroepidemiológico en bovinos de la provincia de La Pampa,2003).

Frössling, J., (2005). "Prevalence and transmission of *Neospora caninum* within infected Swedish dairy herds. *Veterinary Parasitology* **128**(3–4): 209-218.

Gamón J. Detección de anticuerpos de *N. caninum* en la zona norte de la cuenca lechera del departamento de Santa Cruz. y Zootecnia. Bolivia (2003).

Guamán, M, (2011) Resumen neosporosis bovina Univ Cuenca- Ecuador.

Hernandez, J. (2012). Fisiología clínica de la reproducción (primera ed). Mexico: DCV.

Hietala, S. K. C. T. Thurmond. (1997). *N. caninum* infection in cattle. United States Animal Health Association Proceeding. 4p. Disponible en línea:

Hincapie, J. C. (2005). Reproducción animal aplicada: Fundamentos de la fisiología y biotecnología. Tegucigalpa: Litocom Editorres.

Hincapie, J. C. (2008). Trastornos reproductivos en la hembra bovina. Tegucigalpa: Litocom.

Hobson, J.C. (2005). Risk factors associated with *N.caninum* abortion in Ontario Holstein dairy herds. *Vet Parasitol.* 127(3): 177-188.

López, G. (2007) "Estudio para evidenciar la presencia de *N. caninum* en bovinos de la hacienda San Pedro en el municipio de Fredonia". Univ. CES Colombia 2007. Pág 7-13

Lozada E. "Determinación de la presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en hatos lecheros de la sierra Centro Norte del Ecuador, por Prueba Inmunoenzimática". Tesis de Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Central del Ecuador. Julio 2004. Disponible en:



Maldonado, J. (2013) "Relación entre la seroconversión positiva de vacas Holstein a *N. Caninum* y el aborto, muerte fetal temprana, momificación fetal, gestación a término, y mortalidad neonatal" Univ de Cuenca- Ecuador 11(3).

Mcallister, M. D. (1998). "Dogs are definitive hosts of *N. caninum*. Int Parasitol" . Estados Unidos.

Moore D, Odeón A, Venturini M y Campero C. Revista argentina de microbiología: Neosporosis bovina: "Conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación". (En línea). Balcarce 2005. 37: 217-228.

Moore, D. (2001)." Portal Veterinario. Neosporosis bovina. Retrieved from

Moore, D. (2013). "*N. caninum* causes severe economic losses in cattle in the humid pampa region of Argentina". Trop Anim Health Prod. 45 (5): 1237-1241.

Moore, D.P., (2009). Risk factors associated with *N. caninum* infections in cattle in Argentina. Vet Parasitol.161 (1): 122-125.

Oviedo T, Betancur C, Maestra A, González M, Mestra P, Reza L. Rev.MVZ: Estudio serológico sobre neosporosis en bovinos con problemas reproductivos en Montería, Córdoba, Colombia. Junio 2006. Vol. 12(1): Pág. 929-933.

Peréz F.J. (2004) "Variabilidad adaptativa y patogénica en "*N. caninum*" Tesis doctoral Univ. De Madrid 2004 pág. 14 y 15.

Quintanilla, G. (1999). Seroprevalencia de *N.caninum* en hatos lecheros. España: int.j.parasitol.

Rodríguez, A. (2015). Transmisión horizontal y vertical de *N. caninum* en tres sistemas de cría bovina".Univ Argentina pág10-25 .

Sanderson, m.w., gay, j.m., baszler, T.V. (2000). *N. caninum* seroprevalence and associated risk factors in beef cattle in the northwestern United States. Vet Parasitol. 90(1): 15-24.



Suarez C, Maldonado, J.(2012) Seropositividad a *N. caninum* en unidades de producción bovina del estado Lara, Venezuela Univ Centroccidental Vol. 30 No1

Valenzuela, P (2005). Neosporosis en bovinos y caninos neosporosis.

Wouda, W. (1998). Neospora abortion in cattle, aspects of diagnosis and epidemiology. PhD. Tesis, Univ. Utrecht. The Netherlands. 1- 176

The avidity (functional affinity) of specific antibodies are being used to estimate duration of bovine *Neospora caninum* infection. Here, we report for the first time the avidity pattern in cattle orally inoculated with *N. caninum* oocysts. In all, 16 pregnant cows and 7 calves were administered *N. caninum* oocysts. In the cows, the avidity increased during the early course of infection. In all but one, the avidity was ≤ 35 during the first 6 weeks after infection and no cow had an avidity value > 50 until week 9. The calves were sampled either week 6 ($n = 3$) or week 9 ($n = 9$) after infection, and by then had avidities between 2 and 17. The results are in agreement with results from previous investigations of naturally infected cattle, and calves that were experimentally infected with tachyzoites. They further validate the ability of the *N. caninum* iscom avidity ELISA to accurately assess the duration of infectio

ANEXOS.

ANEXOS 1. Transmisión del Neospora Caninum

