



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**MAESTRÍA EN MEDICINA CANINA Y FELINA**

**TITULO:**

“Diagnóstico molecular de la infección gastrointestinal de *Neospora caninum* en caninos”.

Tesis previa a la obtención del título de Magíster en Medicina Canina y Felina.

**AUTOR:** Pedro Bernini Barbecho Quinche.

**CI:** 0103383964

**DIRECTOR:** Dr. Antonio Javier Vallecillo Maza, PhD.

**CI:** 0151059417

Cuenca - Ecuador

2018

## Resumen

La Neosporosis es una infección parasitaria causada por el protozoo *Neospora caninum*, el mismo que fue observado por primera vez en 1984; siendo sus hospederos definitivos los mamíferos pertenecientes a la familia de los canes, tales como perros, coyotes, dingos, etc., y sus hospederos intermediarios son los mamíferos pertenecientes a la familia de los bóvidos, además del ganado ovino, caprino, etc.

Este parasito se caracteriza por causar una gran variedad de síntomas neurológicos en los animales infectados, como pueden ser ataxia, atrofia muscular y dolor muscular en canes; mientras que en el ganado pueden causar abortos, reabsorción o momificación fetal, entre otras patologías.

El presente trabajo investigativo es de tipo cuantitativo trasversal, ya que se planteó con la finalidad de conocer la sensibilidad y especificidad diagnóstica de este parasito en canes del área rural del cantón Cuenca en el año 2017, para ello se realizó un examen de heces a través de los métodos diagnósticos de flotación (Azúcar de Sheather) y PCR a 100 canes elegidos aleatoriamente, para posteriormente comparar los resultados obtenidos mediante estas dos técnicas y presentar los análisis estadísticos mediante tablas simples y compuestas.

Se obtuvo como resultado una incidencia del 6 % (6 casos) al examen coproparasitario y una incidencia del 1.06 % (1 caso) mediante la técnica PCR, a pesar de ello, no existió una relación estadística entre estas dos variables, debido principalmente a la baja sensibilidad y especificidad del examen coproparasitario en relación con el examen PCR.

**Palabras clave:** neosporosis, canes, cuenca, PCR, flotación

---

---

### Abstract

Neosporosis is a parasitic infection caused by the protozoan *Neospora caninum*, the same that was first observed in 1984; its definitive host is the mammals of the family of dogs, coyotes, dingos, etc., and their intermediary hosts are the bovine family, sheeps, goats, etc.

This parasite is characterized by causing a long variety of neurological symptoms in infected animals, such as ataxia, muscular atrophy and muscle pain in dogs; while in cattle they can cause abortions, reabsorption or fetal mummification, among other pathologies.

This research work is a quantitative cross - sectional type, since it was proposed with the purpose of knowing the sensitivity and specificity diagnostic of this parasite in dogs of the rural area of the canton Cuenca in the year 2017, for this it was done a test of feces through the diagnostic methods of Sheather's Sugar and CRP to 100 randomly chosen dogs, to later compare the results obtained by these two diagnostic techniques and present statistical analyzes using simple and composite tables, as well as statistical graphs.

An incidence of 6 % (6 cases) was obtained as a result of the coproparasitology examination and an incidence of 1.06 % (1 case) using the PCR technique, however, there was no statistical relationship between these two variables, because the coproparasitology examination has a low sensitivity and specificity of in relation to the PCR test.

**Key words:** neosporosis, dogs, Cuenca, PCR, floating

---

---

## Índice de contenidos

Resumen .....	2
Palabras clave: neosporosis, canes, cuenca, PCR, flotación.....	2
Abstract .....	3
Índice de contenidos .....	4
Índice de tablas .....	5
Índice de figuras .....	5
Índice de anexos .....	6
Capítulo I.....	11
Introducción.....	11
1.1 Objetivos .....	12
1.1.1 Objetivo general.....	12
1.1.2 Objetivos específicos .....	12
Capitulo II .....	13
Revisión bibliográfica .....	13
2.1 <i>N. caninum</i> .....	13
2.2 Ciclo biológico .....	14
2.3 Signología clínica .....	16
2.4 Diagnóstico .....	18
2.5 Prevención y tratamiento .....	20
Capitulo III .....	22
Materiales y métodos .....	22
3.1 Materiales para la colecta, transporte y conservación de muestras.....	22
3.1.1 Materiales biológicos .....	22
3.1.2 Materiales de trabajo y químicos .....	22
3.2 Procedimiento para la recolección y transporte de muestras.....	22
3.4 Análisis de laboratorio de las muestras mediante técnica de flotación .....	23
3.5. Análisis de laboratorio mediante técnica de reacción en cadena de las polimerasas (PCR) .....	24
Capitulo IV.....	32
Resultados .....	32
Capítulo V.....	35
Discusión.....	35
Capítulo VI.....	38

---

Conclusiones y recomendaciones.....	38
4.1 Conclusiones.....	38
4.2 Recomendaciones .....	38
Capitulo VII.....	39
Referencias bibliográficas .....	39
Anexos .....	43

### Índice de tablas

<b>Tabla 1:</b> Distribución de los 100 perros estudiados en el área rural del cantón Cuenca según el resultado obtenido en el examen coproparasitario. ....	32
<b>Tabla 2:</b> Distribución de los 100 perros estudiados según el resultado obtenido en el examen coproparasitario en relación con el resultado obtenido mediante PCR con las 94 muestras validadas. ....	34

### Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Electroforesis en gel de agarosa-TAE con los productos de PCR del control de proceso. Carril MPM, Marcador de peso molecular, Control negativo; 1, 2, 3 y 4 muestras 1, 2, 3 y 4.....	33
<b>Figura 2:</b> Electroforesis en gel de agarosa-TAE con los productos de PCR del control de proceso. Carril MPM, Marcador de peso molecular, Control negativo; 1, 2 y 3 muestras 89, 90 y 91.....	34
<b>Figura 3:</b> Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con <i>Neospora caninum</i> , muestra 27.....	43
<b>Figura 4:</b> Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con <i>Neospora Caninum</i> , muestra 42.....	43
<b>Figura 5:</b> Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con <i>Neospora Caninum</i> , muestra 54.....	44
<b>Figura 6:</b> Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con <i>Neospora Caninum</i> , muestra 68.....	44
<b>Figura 7:</b> Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con <i>Neospora Caninum</i> , muestra 76.....	45



**Figura 8:** Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con *Neospora Caninum*, muestra 83.....45

**Figura 9:** Equipo de electroforesis utilizado para la detección de *Neospora Caninum* mediante la técnica de PCR.....46

**Figura 10:** Gradilla para microtubos con las muestras fecales.....46

**Figura 11:** Equipo de electroforesis con gel de agarosa al 1,5% utilizada para el diagnóstico de *Neospora caninum*.....47

**Figura 12:** Tabla de contingencia para la distribución Chi Cuadrado.....48

### Índice de anexos

**Anexo 1** Fotografías de imágenes compatibles con ooquistes de *N. caninum* obtenidas a través del microscopio durante el examen coproparasitario. .... 43

**Anexo 2:** Equipo de electroforesis utilizado para la realización de la prueba de PCR. 46

**Anexo 3:** Tabla de distribución Chi Cuadrado utilizada para la interpretación de resultados..... 48

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

Pedro Bernini Barbecho Quinche en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "**DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN GASTRO INTESTINAL DE NEOSPORA CANINUM EN CANINOS**", 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 29/1/2018



Pedro Bernini Barbecho Quinche  
C.I.: 0103383964

Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo Pedro Bernini Barbecho Quinche, autor del trabajo de titulación **"DIAGNOSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN GASTROINTESTINAL DE NEOSPORA CANINUM EN CANINOS"**, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 29/1/2018



Pedro Bernini Barbecho Quinche

C.I: 0103383964



### **Dedicatoria**

A mi amada esposa y mi hijo que a más de ser siempre mi fuente de inspiración y ganas de superación fueron el pilar fundamental para lograr cumplir esta meta.

A todas aquellas personas que de una u otra manera aportaron para poder elaborar este trabajo.

## Agradecimientos

Al Dr. PhD. Antonio Javier Vallecillo Maza por su gran labor como director de este trabajo de tesis.

A los miembros del tribunal por su colaboración y sugerencias brindadas para llegar a final termino de este trabajo.

A todas las personas que brindaron su apoyo en la toma de muestras.



## Capítulo I

### Introducción

El diagnóstico de la Neosporosis en canes en las zonas rurales del Ecuador, representa una serie de dificultades centradas principalmente en el momento de tratar de llegar a un diagnóstico por medio de métodos convencionales, como el método de flotación; siendo un problema adicional el hecho de que la persona que realiza esta técnica no tenga la suficiente experiencia y por ende exista la posibilidad de que se presenten algunos casos de falsos negativos o falsos positivos, puesto que se debe diferenciar los ooquistes de *Neospora caninum* (*N. caninum*) de los de cualquier otro coccidio, como por ejemplo de *Toxoplasma gondii*.

A pesar de los avances en la medicina veterinaria y el cuidado especial que pueden llegar a recibir los canes dentro de la ciudad, en el área rural persisten cuidados de salud rudimentarios o nulos en la mayoría de los casos, lo cual propicia a que los canes de esta zona padezcan enfermedades parasitarias o infecciosas, lo cual puede representar un impacto económico negativo para aquellas familias que basan su economía en la crianza de ganado bovino debido a la estrecha convivencia con canes y la predisposición a enfermedades que podría generarse; motivo por el cual se hace necesario tener herramientas diagnósticas más confiables para establecer un diagnóstico de ésta enfermedad en la población canina.

El conocer la información epidemiológica y el mejor método de detección de este parásito en los canes de la ciudad de Cuenca, más específicamente en aquellos animales que habitan el área rural, es de gran importancia, ya que se debe tener en cuenta que este parásito no solo afecta a los caninos, sino que también puede transmitirse al ganado bovino, afectando su reproducción causando abortos y muerte fetal, lo cual implica importantes pérdidas económicas en la industria ganadera debido al alargamiento de los períodos sin lactancia a causa del incremento del intervalo entre partos (Delgado, Sandoval, & Montenegro, 2017).

El presente trabajo investigativo se planteó con la finalidad de determinar la presencia de la *N. caninum* en perros de las parroquias rurales del Cantón



Cuenca, en la Provincia del Azuay en el año 2017; además, identificar las posibles diferencias diagnósticas entre el método de flotación y el molecular.

Por lo arriba descrito, en el presente trabajo se plantearon los siguientes:

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo general**

Evaluar la aplicación de la prueba Reacción en Cadena de las Polimerasas (PCR), para el diagnóstico de *N. caninum* en muestras de heces de perros.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

Diagnosticar la infección por *N. caninum* en perros de las parroquias rurales del cantón Cuenca, mediante el método de flotación.

Diagnosticar la infección por *N. caninum* en perros mediante el ensayo molecular de PCR.

Estimar las variables de rendimiento diagnóstico de la prueba de PCR en relación al diagnóstico por flotación de la neosporosis canina.



## Capítulo II

### Revisión bibliográfica

#### 2.1 *N. caninum*

*N. caninum* es un parásito protozoario intracelular obligado incluido en el phylum Apicomplexa, clase Sporozoa, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriana y familia Sarcocystidae (Bulla & Vanegas, 2015).

Los primeros reportes de Neosporosis canina datan del año 1984 en Noruega, cuando Bjerkas observo un caso de encefalitis y miocarditis en caninos, el cual fue atribuido a un protozoario que Dubey *et al.*, lo nombrarían *N. caninum* en 1988, tiempo después Thilsted *et al.* (1989), reportaron casos de abortos en bovinos atribuidos a este parasito. Posteriormente se observaría un aumento de casos de abortos en bovinos a causa de *N. caninum* que mediante el estudio de las cepas aisladas quedaría claro su relación con la infección en canes (Wagner, 2008).

Este protozoario perteneciente al Género Neospora tiene como hospedero definitivo al perro, aunque se ha reportado en ciertas partes del mundo a otros canes, como coyotes o lobos; mientras que el ganado bovino, ovino y caprino son considerados como hospederos intermediarios. La importancia epidemiológica, clínica y económica radica en que este parasito es la principal causa de abortos en el ganado bovino (Consejo Europeo para el Control de Parasitosis en Animales de Compañía, 2013).

*N. caninum* no infecta únicamente a canes o hatos lecheros, sino también se ha comprobado la infección en camélidos de Sudamérica, un ejemplo de ello es el estudio realizado por Casas *et al.*, (2006), quienes realizaron un estudio en llamas de la Unidades de Producción de Corpacancha, Cuyo y Santa Ana, en el departamento de Junín en Perú en donde se analizaron mediante la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), muestras sanguíneas de 175 llamas hembras en edad reproductiva, obteniendo un total de 5 animales seropositivos para *N. caninum* (Casas, y otros, 2006).

Vázquez (2007), en su artículo cita a varios autores que hacen referencia a la incidencia de este parásito en animales domésticos, uno de estos artículos citados es de Dubey *et al.*, (2007), en donde se refiere que la incidencia de la neosporosis en canes difiere según la región o zona donde habita el animal, ya



que se ha comprobado que las tasas de seropositividad en perros del área rural, principalmente en granjas, es mucho mayor que la de perros del área urbana; además, este autor también cita a Bartles *et al.*, (1999), y a Wouda *et al.*, (1999), quienes mencionan en sus trabajos que se ha demostrado la asociación positiva entre la transmisión horizontal del parásito entre perros de granja y ganado vacuno, puesto que el hospedero definitivo elimina quistes por medio de las heces, contaminando el pasto, forraje e incluso el agua, (Vázquez, 2007).

En nuestro medio (América Latina), se han realizado estudios que demuestran la presencia de este parásito en animales de la región, tal es el caso de De Souza *et al.*, (2002), quienes detectaron una prevalencia de la infestación del 21.6% en perros de establos en Brasil, también está Silva (2002) quien refiere una prevalencia del parásito o de la exposición del 29.6% en bóvidos del Valle de Lima; un antecedente epidemiológico importante a tener en cuenta en nuestra región data del año 1999 en Argentina, cuando Basso, determino que el 73.3% de perros que convivían con hatos lecheros presentaban serología positiva para la infección por *N. caninum*. Un estudio más reciente en canes de establos lecheros de la costa del departamento de Lima en Perú, dio como resultado que el 32.7% de los canes estudiados presentaron serología positiva para *N. caninum* (Campo, y otros, 2004).

## 2.2 Ciclo biológico

*N. caninum* es un parásito intracelular obligado, el cual es causante de neosporosis en animales de sangre caliente, causando diferentes alteraciones a nivel neurológico y en la reproducción, (Costa, 2016). Este parásito puede infectar a animales domésticos, como perros, vacas y caballos, pero también puede afectar a animales salvajes como coyotes, dingos e incluso modelos experimentales han logrado una infección positiva en roedores de laboratorio, siendo todos estos animales los hospederos definitivos del parásito, es decir, en ellos ocurre la reproducción sexual (Al-Qassab, Reichel, & Ellis, 2010).

El ciclo de vida de *N. caninum* se caracteriza por tener tres estadios: el primer estadio comprende la etapa de taquizoitos, cuya morfología puede ser ovoide, semilunar o globosa; estos se ubican a nivel citoplasmático dentro de una



vacuola denominada vacuola parasitófaga, donde se multiplican rápidamente. En este estadio el parásito puede encontrarse infectando neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos del musculo estriado, hepatocitos, etc., (Ravelo, 2009).

La segunda etapa o estadio de la vida del parásito, comprende la formación de quistes tisulares, cuyo contenido son los bradizoitos del parásito, denominados así por su lenta división; los quistes tisulares pueden medir entre 7-8  $\mu\text{m}$ , su forma es redonda u ovalada, su pared es lisa con un grosor de 4  $\mu\text{m}$ . Esta forma es la que el parásito adopta durante la fase crónica de la enfermedad, pudiendo ubicarse en tejido nervioso central y periférico, además del musculo esquelético del hospedero y en el caso de las hembras también se ubica en el útero (Bulla & Vanegas, 2015).

La tercera etapa de la vida de este parásito comprende la forma de esporozoito dentro de ooquistes esporulados (cada ooquiste esporulado tiene dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno); los ooquistes tienen una superficie lisa con un grosor de pared entre 0.6-0.8  $\mu\text{m}$  y una forma ovoidea o elipsoidal, además carecen de color. Este estadio es la forma infectante ya que son expulsados al exterior mediante las heces del hospedero definitivo, pudiendo sobrevivir en el ambiente por meses e incluso años hasta ingresar a un organismo susceptible donde rápidamente se dividen en taquizoitos, los cuales lentamente proliferan en forma de bradizoitos dentro de quistes tisulares (Costa, 2016).

El ciclo biológico de este parásito involucra hospederos intermediarios en los cuales se han aislado quistes tisulares en los diferentes tipos de tejidos, entre estos podemos encontrar ganado bovino, ovino, caprino, canes y otras especies de mamíferos. En cuanto a los canes, la manera en la que se infectan es mediante la ingestión de tejidos de animales infectados, placenta, carne, viseras, etc. cabe mencionar que también se los considera como hospederos definitivos, ya que en ellos además de ocurrir la reproducción asexual (merogonia) también ocurre la reproducción sexual mediante gametogonios (Bulla & Vanegas, 2015)

El modo de transmisión de este parásito puede ser de dos tipos, el primero es de forma horizontal, es decir, el parásito ingresa a un hospedero susceptible mediante el alimento o el agua con ooquistes procedentes de las heces de otro



animal infectado, principalmente canes; mientras, que la segunda manera de transmisión de la enfermedad es de forma vertical, es decir de la madre infectada hacia la cría durante el periodo de gestación (Portocarrero, Pinedo, Falcón, & Chávez, 2016)

En humanos se sospecha que podría existir un subdiagnóstico como en el caso de Toxoplasmosis y se considera que este parásito tiene potencial zoonótico, ya que estudios experimentales con mono Rhesus demostraron la infección en primates, aunque a la actualidad no se ha demostrado una infección en humanos (Valenzuela, 2005).

### 2.3 Signología clínica

Los signos de la enfermedad se manifiestan principalmente por la replicación de los bradizoitos dentro de los tejidos del organismo, ya sea por infección primaria o por reactivación de los quistes tisulares, lo que provocará que los parásitos invadan la placenta y los tejidos fetales, causando procesos inflamatorios necrotizantes que pueden derivar en la eliminación del parásito, animales con infección crónica o infección y muerte fetal en caso de que el animal esté en estado gravídico (Maldonado, 2013).

Donahoe *et al.*, (2015), mencionan que se ha demostrado experimentalmente que durante la etapa aguda de la infección por *N. caninum* la respuesta inmunológica del hospedero es de tipo Th1 (Linfocito T colaborador 1), es decir, será mediada por la producción de interferón- $\gamma$ , células asesinas naturales (NK), e interleucina 12 (IL-12), además, se puede observar la participación de los linfocitos T CD4 cebados y linfocitos CD8, esta respuesta inmunológica del hospedero es la que ocasiona una restricción de la replicación del parásito e induce la formación de quistes en los tejidos del animal, causando una infección latente. En situaciones donde el hospedero presenta algún tipo de inmunomodulación, como puede ser la gestación, esta respuesta inmune será de tipo Th2 (Linfocito T colaborador 2), caracterizándose principalmente por la producción de interleucina 4 (IL4), lo cual provocará una transformación de bradizoito a taquizoito, causando una replicación parasitaria incontrolada que ocasionará un recrudecimiento o reagudización de la enfermedad (Donahoe, Lindsay, Krockenberger, Phalen, & Šlapeta, 2015).





En los canes se ha demostrado que a partir de la quinta semana luego del nacimiento aparecen signos clínicos, principalmente neurológicos y letales en ciertos casos, como parestesia de miembros posteriores, ataxia progresiva, atrofia muscular y dolor muscular, aunque también son comunes las alteraciones de músculos autónomos, siendo afectada la deglución y los movimientos oculares, lo cual demuestra una transmisión transplacentaria desde la madre a las crías. En perros adultos la infección se manifiesta con dermatitis ulcerativa, miocarditis, neumonía e incluso pancreatitis (Consejo Europeo para el Control de Parasitosis en Animales de Compañía, 2013).

En los bovinos se ha comprobado que la manera en que se infectan es mediante la ingesta de ooquistes eliminados en las heces del hospedero definitivo (perro), ya que estas por lo general son eliminadas en el pasto e incluso pueden contaminar el agua, considerándose la presencia de perros entre el rebaño como un factor de riesgo. Otra forma de contagio demostrada es mediante la placenta, pudiendo encontrarse serología positiva tanto en la madre como en su descendencia en el periodo post natal, (Ravelo, 2009).

En el ganado bovino la mayor parte de las infecciones son de tipo subclínico, es decir, no se presentará ningún tipo de signología en el animal; sin embargo, existen casos en los que se presentarán una gran variedad de signos, siendo el aborto el más común de ellos, aunque también puede presentarse nacimientos prematuros, terneros con deficiencias neurológicas o de menor tamaño, también pueden presentarse terneros con severos déficits de la médula espinal, lo cual afecta su propiocepción y equilibrio (McAllister, 2016).

La transmisión placentaria es la forma más importante de contagio en el ganado confirmándose la presencia del parásito en fetos abortados y en terneros recién nacidos, esto se debe a que el parásito tiene predilección por el epitelio corial fetal y por los vasos sanguíneos de la placenta, lo cual ocasiona una vasculitis fetal y degeneración del corion con necrosis del lecho placentario (Delgado, Sandoval, & Montenegro, 2017). Como se mencionó antes, la principal afección que produce en el ganado bovino es aborto del producto gestante como resultado de una infección fetal posterior a una parasitemia materna, lo cual ocurre generalmente desde el tercer mes de embarazo, pero también se puede presentar muerte intrauterina, momificación, autólisis o en algunos casos puede llegar hasta el nacimiento, presentando bajo peso, ataxia,



diminución de reflejos osteotendinosos, exoftalmia e incluso parálisis completa (Bulla & Vanegas, 2015).

## 2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de Neosporosis en canes, bóvinos u otras especies de mamíferos se puede realizar de diferentes maneras, una de ellas comprende el examen microscópico de las heces del animal en estudio, esta técnica tiene baja especificidad debido a que los ooquistes de la *N. caninum* son indistinguibles de los quistes de otros coccidios, como por ejemplo *Hammondia heydorni*, *Hammondia hammondi* e incluso *Toxoplasma gondii* (Hill, Liddell, Jenkins, & Dubey, 2001). Mientras que otra manera es mediante técnicas moleculares, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuya sensibilidad y especificidad en heces se ha demostrado que es mayor que el examen microscópico (Dalimi, Sabevarinejad, & Forouzandeh, 2014).

En hatos lecheros el diagnóstico de neosporosis neonatal se puede realizar mediante un examen histológico de los tejidos de fetos abortados, principalmente el corazón, cerebro e hígado, mediante la tinción con Hematoxilina-Eosina, pudiendo observarse las lesiones causadas por el protozoo; mientras que otro método de detección de este parásito utilizado principalmente en vacas adultas, es la técnica de ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, del Inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), la cual está orientada a encontrar la presencia y cuantificar los niveles de anticuerpos en el suero del bóvido, pudiendo llegar a tener una sensibilidad diagnóstica del 100% y una especificidad del 96% (Delgado, Sandoval, & Montenegro, 2017).

Al momento de realizar el diagnóstico coproparasitológico es necesario tener en cuenta que la técnica de flotación mediante soluciones con Sacarosa o con Sulfato de zinc son una excelente manera de aislar los ooquistes de *N. caninum* en heces, pero existen limitaciones en la técnica, ya que esta comprende un proceso laborioso además que los canes que presentan signos clínicos de la infección no eliminan ooquistes en sus heces (el parásito se encuentra en sus tejidos); motivo por el cual esta técnica es útil solamente para



establecer un perfil epidemiológico, más no para la realización de un diagnóstico certero (Costa, 2016).

La similitud entre los ooquistes de *N. caninum* y los ooquistes de *Hammondia heydorni* y *Toxoplasma gondii* es tal que en un estudio realizado en Irán con 174 perros, entre perros de granja y perros domésticos, demostró que el análisis de heces no aporta datos de relevancia, puesto que al realizar el examen coproparasitario se obtuvieron un total de 4 ooquistes, sin poder diferenciar el parásito al cual pertenecían, por lo que se realizó la prueba PCR, logrando diferenciar que dos ooquistes pertenecían a *N. caninum* y los restantes pertenecían a *Hammondia heydorni*, un parásito que también utiliza a los canes como sus hospederos definitivos (Gholamreza, 2009).

También es necesario considerar que debido a que las formas parasitarias se encuentran en tejido muscular o nervioso del animal, la eliminación de ooquistes por las heces, detectada por el método microscópico, no es de gran relevancia clínica, ya que para establecer un diagnóstico certero de Neosporosis en aquellos animales con sospecha clínica se deben realizar técnicas moleculares como la PCR, en muestras de líquido cefalorraquídeo o biopsias musculares, debiendo tener en cuenta que el parásito es detectable mediante pruebas serológicas a partir de la segunda semana tras la infección, motivo por el cual el diagnóstico definitivo de este parásito debe realizarse mediante análisis del cuadro clínico junto con serología positiva (ELISA o Inmunofluorescencia indirecta) (Consejo Europeo para el Control de Parasitosis en Animales de Compañía, 2013).

Al momento de realizar un diagnóstico de Neosporosis, se debe tener en cuenta que dentro del Género Neospora existen diferentes subespecies, una de ellas es la misma *N. caninum*, causante de enfermedades neurológicas en canes y bovinos, tales como radiculopatías, encefalopatías, polimiositis y parálisis ascendente, incluso modelos experimentales en ratones han demostrado que este parásito, además de causar sinología neurológica, es capaz de causar neumonía e incluso pancreatitis. Otro sub especie de neospora fue denominada *N. hughest*, ésta fue aislada por primera vez en la médula espinal de equinos con diagnóstico de mieloencefalitis. Al realizar una prueba de PCR en diferentes muestras de neospora se pudo encontrar los segmentos característicos de ADN denominados Np6 (5'-



CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT-3'), Np21 (5'-CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC-3'), F6 (GGGAATTCGG) y B13 (TTCCCCCGCT); la utilidad del reconocimiento de estos segmentos radica en el hecho de que el segmento F6 sirve para diferenciar la neospora de miembros del phylum Apicomplexa, como pueden ser el *Toxoplasma gondii*, la *Sarcocystis muris*, *Plasmodium falciparum*, entre otros, puesto que estos parásitos carecen de este segmento, mientras que los segmentos Np6 y Np21 se los puede observar en *N. caninum* pero no en *N. hughesi*, por lo que esta prueba es de gran utilidad, no solamente para diferenciar neospora de los otros miembros del phylum Apicomplexa, sino también para diferenciar entre las diferentes especies de neospora (Spencer, Witherow, & Blagburn, 2000).

## 2.5 Prevención y tratamiento

El principal método de prevención para la propagación de este parásito consiste en evitar aquellos factores de riesgo que facilitan la infección por *N. caninum*, Portocarrero *et al.*, identificaron factores de riesgo que propician la transmisión de la infección por este parásito en canes y bóvidos, encontrando que la seroprevalencia es mucho mayor en granjas que tienen más de 3 perros que en granjas donde no los hay o tienen menos canes, otro factor de riesgo que se debe evitar es eliminar los restos de animales muertos al aire libre, ya que esto incrementa el riesgo de infección hasta un 19,3% (Portocarrero, Pinedo, Falcón, & Chávez, 2016).

La vacunación contra *N. caninum* ha demostrado ciertos niveles de efectividad en ganado vacuno y ratones, puesto que modelos experimentales con vacunación subcutánea o intravenosa han reducido los índices de abortos en las madres y la presencia del parásito en terneros de madres infectadas cuyo diagnóstico se comprobó mediante PCR y ELISA (Weber, y otros, 2013).

En el caso particular del ganado bovino no existe un tratamiento específico para la enfermedad, por lo cual se considera que la prevención es de vital importancia, debiéndose eliminar aquellos productos del aborto en vacas seropositivas, además debe realizarse la separación gradual de aquellos animales infectados del resto del ganado con la finalidad de evitar la propagación del parásito a otros individuos sanos (Bulla & Vanegas, 2015).



En cuanto a los canes, se recomienda que a aquellas hembras seropositivas se les impida el desarrollo de crías y en aquellos casos de convivencia junto con reses se debe evitar el alimentar a los canes con carne cruda, además se debe mantener un control sobre las excretas caninas para que estas no contaminen el pasto o el agua. En caso de presentarse un cuadro neurológico por infección en canes adultos se debe iniciar con el tratamiento lo más pronto posible, incluso antes de la confirmación serológica, el tratamiento es a base a Clindamicina en dosis de 20 mg/kg dos veces al día durante 30 a 60 días (Consejo Europeo para el Control de Parasitosis en Animales de Compañía, 2013).

La Neosporosis neonatal canina es un cuadro que se caracteriza por la presencia de paresias o parálisis del cuerpo posterior, el tratamiento para este tipo particular de casos es en base a Clindamicina, a dosis de 12,5 a 18,5 mg/kg/12 horas por vía oral durante 2 a 4 semanas, aunque también se puede realizar la combinación de Pyrimethamina en dosis de 0,25 a 0,5 mg/kg y Sulfonamidas en dosis de 30 mg/kg, ambos medicamentos por vía oral cada 12 horas durante 4 semanas (Mainato, 2011).



## Capítulo III

### Materiales y métodos

#### 3.1 Materiales para la colecta, transporte y conservación de muestras

##### 3.1.1 *Materiales biológicos*

- Material fecal de los 100 perros seleccionados aleatoriamente.

##### 3.1.2 *Materiales de trabajo y químicos*

###### 3.1.2.1 *Materiales de trabajo y escritorio*

- Mandil.
- Guantes de látex descartables.
- Esferográficos.
- Marcador rotulador de muestras.
- Tubos.
- Fundas plásticas.
- Gel refrigerante.
- Cooler.

###### 3.1.2.2 *Materiales químicos*

Etanol en solución al 70 %.

#### 3.2 Procedimiento para la recolección y transporte de muestras

1. El presente proyecto investigativo comprendió la recolección de material fecal de una muestra aleatoria de 100 perros del área rural del cantón Cuenca; la cantidad recolectada de cada can varió entre 3 a 5 g, de los cuales una porción de aproximadamente 1 g fue conservada en 9 volúmenes (ml) de una solución de Etanol al 70%.
2. En cuanto al almacenaje y transporte de las muestras recolectadas, estas fueron trasladadas al laboratorio clínico de la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cuenca en un cooler que contenía sobres de gel refrigerante.

#### 3.3 Materiales para el análisis de las muestras mediante el análisis coproparasitológico



### 3.3.1 *Materiales biológicos*

- Muestras de heces colectadas.

### 3.3.2 *Materiales de laboratorio*

- Aplicadores de madera.
- Tubos de ensayo.
- Rejilla para tubos de ensayo.
- Centrífuga de laboratorio.
- Asa de platino.
- Portaobjetos (3 X 1 pulgadas).
- Cubreobjetos (1 X 1 pulgadas).
- Coladores pequeños.
- Microscopio óptico.

## **3.4 Análisis de laboratorio de las muestras mediante técnica de flotación**

1. Las muestras que fueron analizadas en un laboratorio mediante la técnica de flotación de Sheather determinaron la presencia o ausencia de ooquistes de *N. caninum* en las diferentes muestras, esta técnica se basa en la capacidad de flotación que tienen los ooquistes, quistes y huevos de ciertos parásitos, ya que estos tienen una densidad menor que el azúcar, siendo particularmente útil para detectar ooquistes y quistes de protozoos y huevos de helmintos, motivo por el cual es ideal para la detección de Coccidios, Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora, entre otros (Ministerio de Salud de Perú, 2003).

2. Para la realización de la técnica de Sheather mezcló de 2 a 5 g de heces con 15 ml de solución de Sheather, luego se debe disolver las heces en la solución hasta formar una pasta uniforme que tamizó para retirar impurezas, esta pasta se debe colocar en un tubo de ensayo y se centrifuga a 1.500 revoluciones por minuto durante 10 minutos, luego se deja reposar el tubo de ensayo en una rejilla y se coloca más solución de Sheather hasta formar un menisco convexo, se elimina las burbujas y los objetos flotantes con un palillo o una asa de platino, después se coloca un cubreobjetos sobre la superficie impregnándolo con este centrifugado durante 10 a 20 minutos, posteriormente se retira el



cubreobjetos y se lo coloca en el portaobjetos para poder observar en el microscopio (Sixtos, 2011).

3. Para el correcto reconocimiento del parásito en el examen coproparasitario primeramente se analizó mediante el lente objetivo 10X, en la búsqueda de estructuras parasitarias y luego con el lente de 40X para poder identificar las estructuras compatibles con ooquistes de *N. caninum*.

4. Se debe tener en cuenta que los ooquistes no tienen color, su forma es ovoide o elipsoidal, miden entre 10.6 a 12.4  $\mu\text{m}$  de largo por 10.5 a 12  $\mu\text{m}$  de ancho, su pared mide entre 0.6 a 0.7  $\mu\text{m}$  de espesor, es transparente y está conformada por una bicapa, (Silva & Machado, 2016).

### **3.5. Análisis de laboratorio mediante técnica de reacción en cadena de las polimerasas (PCR)**

A la par de la realización del examen mediante la técnica de flotación se realizó el examen correspondiente de cada muestra mediante la técnica PCR, cuya finalidad es la detección específica de ciertas secuencias de ADN, lo cual no se puede realizar mediante exámenes comunes, como puede ser la microscopía (Matín, y otros, 2007); previo a la realización de esta técnica es necesario recordar que estas muestras fueron conservadas en una solución de 8 a 9 volúmenes de Etanol al 70 %. Esta prueba se efectuó con la finalidad de obtener un diagnóstico definitivo de la presencia de ADN de *N. caninum* en las heces de los canes, ya que esta técnica es altamente específica y sensible para la detección de este parásito (Bulla & Vanegas, 2015).

#### *3.5.1 Materiales necesario para la extracción de material genético (ADN) total de las muestras de heces*

##### *3.5.1.1 Material biológico*

- Muestras de heces conservadas en Etanol al 70 %.

##### *3.5.1.2 Materiales químicos y reactivos*

- Solución de lavado (10 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM de EDTA, pH 8.0 y 1.5 % de Polivinilpirrolidona) (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, P5238).





- Solución de lisis 2X (100 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM de EDTA, pH 8.0, 200 mM de NaCl y 4 % de SDS) (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, S3014, 71725).
- Solución de proteínasa K (10 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM de EDTA, pH 8.0, 50 % de Glicerol y 5 mg/ml de Proteínasa K (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, G5516, P2308).
- Solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1 (Sigma, Cat. no.: 77619).
- Etanol absoluto (Sigma, Cat. no.: E7148).
- Etanol al 70 % (Sigma, Cat. no.: E7148 y W4502).
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502).
- Acetato de sodio 3 M, pH 5.2 (Sigma, Cat. no.: S2889)

### *3.5.1.3 Materiales de laboratorio y equipos*

- Cristalería.
- Micropipetas (10, 100 y 1000 µl).
- Puntas para las micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Vortex.
- Tissue Lyser LT
- Microcentrífuga.
- Baño María
- Platina de agitación.
- Balanzas.
- Potenciometro (pHmetro).
- Refrigerador (4 °C).
- Congelador (-20 °C).

### *3.5.2 Procedimiento para la extracción del ADN total de las muestras de heces*

1. Se colocó en tubos eppendorf de 2 ml 10 perlas de metal ( $\varnothing$  2.38 mm, Mobio, Cat. no.: 13117-500) y se adicionó 1 ml de cada una de las muestras resuspendidas en Etanol al 70 %.
2. Las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 12, 000 x g, a temperatura ambiente. Una vez concluida la centrifugación se les eliminó cuidadosamente el Etanol al 70 %.



3. Se adicionó a las muestra 1 ml de la Solución de lavado, fueron resuspendidas las muestras y se centrifugaron en las condiciones antes descritas. La solución de lavado se retiró cuidadosamente de cada una de las muestras y se repitió una vez más el proceso de lavado.
4. Posterior a eliminar la Solución de lavado, se le adicionó a cada una de las muestras 200  $\mu$ l de agua grado biología molecular y 250  $\mu$ l de la Solución de lisis.
5. Se lisaron las muestras durante 5 min en el Tissue Lyser LT (Qiagen) a una velocidad de 50 oscilaciones por s.
6. Una vez lisadas las muestras, se les adicionó 50  $\mu$ l de la Solución de proteinasa K y se incubaron durante toda la noche (14-16 h) a 65 °C en un baño María.
7. Concluida la digestión de las muestras, se les adicionó 500  $\mu$ l de la Solución de Fenol/Cloroformo/A. isoamílico 25:24:1. Las muestras fueron mezcladas en el vortex hasta obtener una emulsión.
8. Para separar las fases, las muestras se centrifugaron por 10 min a 12, 000 x g, a temperatura ambiente.
9. Se retiraron los tubos cuidadosamente de la centrifuga, y de la misma forma se colectó 400  $\mu$ l de la fase acuosa (sobrenadante) de cada una de las muestras y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml nuevos.
10. A cada uno de los sobrenadantes colectados se les adicionó 40  $\mu$ l de una Solución de Acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y 2.5 volúmenes de Etanol absoluto frío.
11. Las muestras fueron mezcladas por inversión e incubadas por 30 min a -20 °C para favorecer la precipitación del ADN.
12. Una vez concluido el periodo de incubación, las muestras fueron centrifugadas por 10 min a 12, 000 x g, a temperatura ambiente para formar una pastilla con el ADN precipitado.
13. Con la pastilla de ADN formada, el sobrenadante fue eliminación por inversión y se le adicionó a las pastillas 500  $\mu$ l de Etanol al 70 %, frío (4 °C).
14. Las pastillas fueron centrifugadas en las condiciones antes descritas, y la Solución de Etanol al 70 % se eliminó.
15. Las pastillas se secaron a temperatura ambiente protegidas del polvo, y de la luz directa.



16. Una vez secas las pastillas de ADN, éstas fueron resuspendidas en 75 µl de agua grado biología molecular y almacenadas a -20 °C hasta su uso en los ensayos de PCR para el control de proceso y el de detección del material genético de *N. caninum*.

### *3.5.3 Materiales para la amplificación de material genético del perro (Control de proceso)*

#### *3.5.3.1 Material biológico*

- Muestras de ADN total.

#### *3.5.3.2 Materiales químicos y reactivos*

- Enzima Taq ADN polimerasa, con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución de 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Cat. no.: 10966-030).

- Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191).

- Oligonucleotidos sentido DOG12S-For (AATTGAATAGGGCCATGAA) (Invitrogen).

- Oligonucleotido antisentido DOG12S-Rev (CTCCTCTTGTTGTTTTAGTTAAGTTAATATG) (Invitrogen). Los oligonucleotidos previamente reportados amplifican un producto de PCR de 101 bp (Matín, y otros, 2007).

- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502).

#### *3.5.3.3 Materiales de laboratorio y equipos*

- Micropipetas (10, 100 y 1000 µl).

- Puntas para las micropipetas.

- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.

- Tubos de PCR.

- Vortex.

- Microcentrífuga.

- Termociclador.

### *3.5.4 Procedimiento para amplificación del control de proceso del ADN total de las muestras de heces*



1. Un tubo de tamaño adecuado, por cada muestra a incluir en el ensayo de amplificación se adicionó los siguientes reactivos, para tener un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l.

<b>Reactivo:</b>	<b>Concentración:</b>	<b>Volumen:</b>	<b>Concentración final:</b>
Agua grado biología molecular.	No aplica.	19.15 $\mu$ l	No aplica.
Buffer de PCR.	10 X	2.5 $\mu$ l	1X
dNTP's	10 mM c/u	0.25 $\mu$ l	0.1 mM c/u
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 $\mu$ l	2 mM
Oligo F DOG12S-For	100 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l	0.8 $\mu$ M
Oligo R DOG12S-Rev	100 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l	0.8 $\mu$ M
Enzima Taq DNA polimerasa	5 U/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.04 U/ $\mu$ l
<b>Volumen final</b>	-----	<b>23 <math>\mu</math>l</b>	-----

2. La mezcla anterior se colocó en un tubo de PCR (250  $\mu$ l) y se adicionó 2  $\mu$ l de la muestra de ADN total correspondiente.

3. Las reacciones de PCR preparadas se colocaron en el termociclador para iniciar el proceso de amplificación de acuerdo al siguiente perfil de temperatura programado.

<b>Etapa:</b>	<b>Desnaturalización</b>				<b>Extensión final</b>
	<b>inicial</b>	<b>40 ciclos</b>			
		<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineamiento</b>	<b>Extensión</b>	
<b>Temperatura</b>	94 °C	94 °C	56 °C	72 °C	72 °C
<b>Tiempo</b>	4 min	45 s	30 s	45 s	5 min

4. Una vez concluido el proceso de amplificación, a cada uno de los tubos se adicionó 5  $\mu$ l de la Solución buffer de carga de ADN 6X, se mezclaron y fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.

### 3.5.5 Materiales para la detección del amplicon del control de proceso

#### 3.5.5.1 Material biológico

- Amplicones o productos de PCR.

#### 3.5.5.2 Materiales químicos y reactivos

- Agarosa (Invitrogen, Cat. no.: 16500-500).

- Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, Cat. no.: T4661, A6283, EDS, S8045).

- Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma, Cat. no.: E7637).

- Solución buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM de EDTA, pH 8.0, 0.3 % de Azul de bromofenol, 0.3 de Xilencianol y 30 % de



Glicerol) (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516).

### 3.5.5.3 *Materiales de laboratorio y equipos*

- Micropipetas (10, 100 y 1000  $\mu$ l).
- Puntas para las micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Tubos de PCR.
- Vortex.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Horno de microondas.
- Balanza.
- Potenciometro (pHmetro).
- Platina de agitación.
- Transiluminador.
- Fotodocumentador.
- Computadora de escritorio.

### 3.5.6 *Procedimiento de electroforesis de los amplicones en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.*

1. Se pesó 0.3 g de agarosa y se adicionó a un matraz Erlenmeyer con 30 ml de Solución buffer TAE 1X, la agarosa se disolvió por calor con ayuda de un horno de microondas.
2. Una vez disuelta completamente la agarosa la mezcla se enfrió y se le adicionó 1  $\mu$ l de una Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml. Se mezcló completamente, y la mezcla fue vaciada en el molde para el gel y se le colocó inmediatamente el peine para formar los pozos.
3. Una vez gelesificada la solución, el gel se colocó en la cámara de electroforesis y se le adicionó la cantidad de Solución buffer TAE 1X necesaria para cubrir completamente el gel.
4. Se procedió a cargar cada una de las muestras en el gel, y en unos de los pocillos se colocó 450 ng del marcador de peso molecular de ADN.
5. Concluido el cargado de las muestras y el marcador de peso, se colocó la tapa y se conectó la corriente eléctrica a un voltaje de 90 por 30 a 45 min.



6. Una vez resueltos los productos de PCR, se visualizaron en el transiluminador y con fotodocumentador se tomó una imagen del mismo.
7. Se consideró como una amplificación positiva la observación de una banda de 101 bp.
8. Todas las muestras (positivas) validadas con este ensayo fueron sometidas a la detección de material genético de *N. caninum*.

### *3.5.7 Materiales para la amplificación de material genético de N. caninum (Amplicon del patógeno)*

#### *3.5.7.1 Material biológico*

- Muestras de ADN total (Validadas con el control de proceso).

#### *3.5.7.2 Materiales químicos y reactivos*

- Enzima Taq ADN polimerasa, con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución de 50 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Cat. no.: 10966-030).
- Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191).
- Oligonucleotidos sentido NcaNp21-For (CAGTCAACCTACGTCTTCT) (Invitrogen).
- Oligonucleotido antisentido NcaNp6-Rev (GTGCGTCCAATCCTGTAAC) (Invitrogen). Los oligonucleotidos previamente reportados amplifican un producto de PCR de 328 bp (Yamage, Flechtner, & Gottstein, 1996).
- Agua grado biología molecular (Sigma, Cat. no.: W4502).

#### *3.5.7.3 Materiales de laboratorio y equipos*

- Micropipetas (10, 100 y 1000 µl).
- Puntas para las micropipetas.
- Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.
- Tubos de PCR.
- Vortex.
- Microcentrífuga.
- Termociclador.

### *3.5.8 Procedimiento para amplificación del producto de PCR del patógeno (N. caninum)*



1. Un tubo de tamaño adecuado, por cada muestra a incluir en el ensayo de amplificación se adicionó los siguientes reactivos, para tener un volumen final de reacción de 25  $\mu$ l.

<b>Reactivo:</b>	<b>Concentración:</b>	<b>Volumen:</b>	<b>Concentración final:</b>
Agua grado biología molecular.	No aplica.	19.15 $\mu$ l	No aplica.
Buffer de PCR.	10 X	2.5 $\mu$ l	1X
dNTP's	10 mM c/u	0.25 $\mu$ l	0.1 mM c/u
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 $\mu$ l	2 mM
Oligo F NcaNp21-For	100 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l	0.8 $\mu$ M
Oligo R NcaNp6-Rev	100 $\mu$ M	0.2 $\mu$ l	0.8 $\mu$ M
Enzima Taq DNA polimerasa	5 U/ $\mu$ l	0.2 $\mu$ l	0.04 U/ $\mu$ l
<b>Volumen final</b>	-----	<b>23 <math>\mu</math>l</b>	-----

2. La mezcla anterior se colocó en un tubo de PCR (250  $\mu$ l) y se adicionó 2  $\mu$ l de la muestra de ADN total correspondiente.

3. Las reacciones de PCR preparadas se colocaron en el termociclador para iniciar el proceso de amplificación de acuerdo al siguiente perfil de temperatura programado.

<b>Etapa:</b>	<b>Desnaturalización</b>				<b>Extensión final</b>
	<b>inicial</b>	<b>40 ciclos</b>			
		<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineamiento</b>	<b>Extensión</b>	
<b>Temperatura</b>	94 °C	94 °C	53 °C	72 °C	72 °C
<b>Tiempo</b>	4 min	30 s	25 s	30 s	5 min

4. Una vez concluido el proceso de amplificación, a cada uno de los tubos se les adicionó 5  $\mu$ l de la Solución buffer de carga de ADN 6X, se mezclaron y fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio de acuerdo a lo descrito.

5. Se consideró una amplificación positiva la detección de un producto de PCR de 328 bp.

### 3.6 Análisis de datos

Luego de haber realizado los análisis de laboratorio correspondientes y haber obtenido los resultados se procedió a crear una base de datos en el software estadístico SPSS 20.0 y en el programa Microsoft Office Excel 2013, la misma que fue utilizada para realizar cálculos de frecuencias y porcentajes, cruces de variables y una prueba de *Chi cuadrado*; finalmente, se presentaran los datos obtenidos y los análisis realizados mediante tablas y gráficos estadísticos.



## Capítulo IV

### Resultados

En la presente investigación se colectaron y analizaron un total de 100 muestras de heces de perros seleccionados al azar dentro del área rural del cantón Cuenca, más específicamente las parroquias de El Valle, Checa, Octavio Cordero y Sinincay.

El análisis de las muestras obtenidas por medio del examen coproparasitario (Ver Tabla 1), reveló que existieron varias muestras en las que se evidenciaron formas parasitarias, aunque únicamente en 6 casos (6 %), se pudo observar oquistes compatibles con *N. caninum*, los mismos que correspondían a las muestras número 27, 42, 54, 68, 76 y 83.

**Tabla 1:** Distribución de los 100 perros estudiados en el área rural del cantón Cuenca según el resultado obtenido en el examen coproparasitario.

<b>Examen coproparasitario</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>Porcentaje</b>
Positivo	6	6 %
Negativo	94	94 %
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100 %</b>

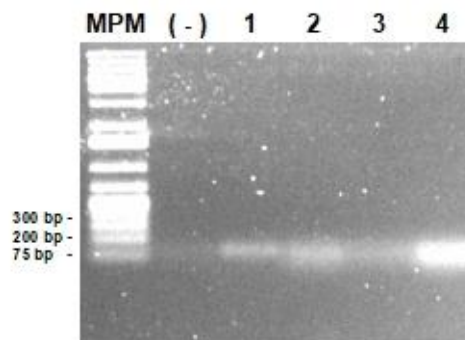
A todas las muestra colectadas y conservadas en Etanol al 70 % se extrajo material genético, para ser amplificado se realizó un control de proceso, que consistió en generar un amplicon (101 bp) a partir de material genético del perro, que corresponde a una región de la secuencia codificante de subunidad ribosomal 12S (Ver Figura 1). Como resultado de la evaluación del control de proceso, se obtuvo que en el 90 % de las muestras se logró purificar ADN total susceptible de ser amplificado, por lo que se procedió a realizar el ensayo de PCR con los iniciadores u oligonucleotidos específicos para la detección de material genético de *N. caninum*.

Con la realización de la prueba de PCR para la detección de *N. caninum* en las muestras de ADN total validadas obtenidas de las heces colectadas de los



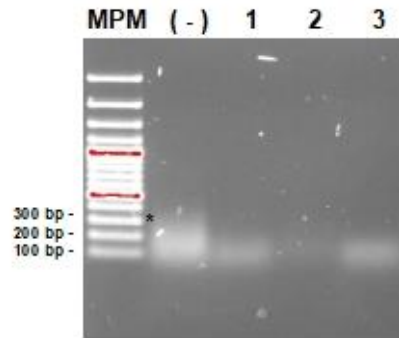


perros incluidos en el presente trabajo (Ver Figura 2), se encontró que únicamente 1 caso (1.06 %), el cual correspondió a la muestra número 89.



**Figura 1:** Electroforesis en gel de agarosa-TAE con los productos de PCR del control de proceso. Carril MPM, Marcador de peso molecular [GeneRuler 1 kb Plus DNA ladder (Thermo, Cat. no.: SM1331)]; ( - ), Control negativo; 1, 2, 3 y 4 muestras 1, 2, 3 y 4.

La realización del análisis estadístico entre estas dos pruebas incluyó la realización de un cruce de los datos de las variables y la realización de una prueba de Chi cuadrado (Ver Tabla 2), en el cual se planteó como hipótesis nula de que no existe relación entre las variables, es decir, entre los resultados obtenidos con el examen coproparasitario y el examen de PCR para la detección de *N. caninum*, mientras que la hipótesis alterna se planteó de que si existe una relación entre variables; esta prueba dio como resultado de que no se puede rechazar la hipótesis nula, con un valor de  $p$  obtenido es mayor a 0.05 por lo que la relación entre estas dos variables no es estadísticamente significativa.



**Figura 2:** Electroforesis en gel de agarosa-TAE con los productos de PCR del control de proceso. Carril MPM, Marcador de peso molecular [GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Thermo, Cat. no.: SM0322)]; (-), Control negativo; 1, 2 y 3 muestras 89, 90 y 91.

**Tabla 2:** Distribución de los 100 perros estudiados según el resultado obtenido en el examen coproparasitario en relación con el resultado obtenido mediante PCR con las 94 muestras validadas.

	Examen de PCR				Total	Valores: Chi <sup>2</sup> GL	Valor <i>p</i> (IC 95%)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo				
<b>Examen coproparasitario</b>	<b>Positivo</b>	0	0%	6	6%	6	6%	0.064
	<b>Negativo</b>	1	1%	93	83%	94	94%	1 0.8
<b>Total</b>	<b>1</b>	<b>1%</b>	<b>99</b>	<b>89%</b>	<b>100</b>	<b>100%</b>		



## Capítulo V

### Discusión

En el presente trabajo investigativo se puede observar que al realizar el examen coproparasitario en las muestras fecales de los 100 canes se pudo observar que en 6 casos, lo cual corresponde a un porcentaje del 6 %, se presentaron ooquistes compatibles con *N. caninum*, dicha cifra es más alta en relación a la obtenida en un estudio realizado por Gholamreza en el área de Mashhad en Irán con 174 canes de granja, el cual revela que 4 muestras de canes presentaron ooquistes compatibles con *N. caninum*, lo cual corresponde a un porcentaje del 2.3 %. (Gholamreza, 2009); dicha diferencia entre los porcentajes obtenidos mediante el examen coproparasitario en el presente trabajo investigativo y el estudio mencionado podría deberse a la diferencia de la prevalencia de este parásito tanto en canes como bóvidos de las dos regiones, puesto en Latinoamérica se han presentado cifras elevadas en la incidencia de este parásito, un ejemplo de ello es el estudio realizado por Campo y otros, quienes refieren que en el año 2002 los investigadores Souza *et al.*, detectaron una prevalencia de *N. caninum* del 21.6 % en perros de establos en Brasil, estos autores además refieren que Silva (2002) menciona en su estudio una prevalencia de este parásito del 29.6 % en bóvidos del Valle de Lima (Campo, y otros, 2004).

Al realizar la prueba de PCR en las muestras de los perros incluidos en el presente estudio se comprobó que únicamente un can presentó infección por *N. caninum*, lo cual corresponde a un porcentaje del 1.06 %, el cual es un porcentaje similar al obtenido por Gholamreza en el año 2004, el cual analizó mediante examen coproparasitario y PCR una muestra de 174 heces canes de granja en el área de Mashhad en Irán, revelando que únicamente 2 muestras correspondían a *N. caninum*, lo cual equivale a un porcentaje de 1.06 % (Gholamreza, 2009); cabe recalcar que en el estudio antes mencionado al realizar el examen coproparasitario se pudieron observar 4 ooquistes compatibles con *N. caninum* de los cuales dos pertenecían a este parásito y los dos restantes a *Hammondia heydorni*, estos falsos resultados positivos en el examen coproparasitario, tanto en el presente estudio como en otros trabajos, se puede deber a la similitud que existe entre los ooquistes de varios coccidios,



tales como la *Hammondia heydorni*, *Hammondia hammondi*, etc., (Hill, Liddell, Jenkins, & Dubey, 2001); así mismo, existen otros autores que también manifiestan la similitud de los quistes de *N. caninum* con los quistes de otros miembros del phylum Apicomplexa, como puede ser el *Toxoplasma gondii* (Yamaga, Flechtner, & Gottstein, 1996).

Otros estudios que han utilizado la técnica de PCR para el diagnóstico de neosporosis en canes han reportado una incidencia mucho mayor del ADN de *N. caninum* en heces de perros, un ejemplo de ello es el estudio realizado por Bulla y Vanegas en el año 2015 con 60 perros del Municipio El Rosal en Colombia, el cual determinó una incidencia del 21.6 % (Bulla & Vanegas, 2015), otro estudio es el presentado por Dalimi *et al.*, quienes refieren que al examinar mediante PCR una muestra de heces de 50 perros con sintomatología neurológica en Brasil obtuvieron una incidencia del 14 % de *N. caninum* (Dalimi, Sabevarinejad, & Forouzandeh, 2014); dicha diferencia entre los datos puede deberse a que todos los canes de los estudios mencionados convivían en estrecha relación con el ganado bovino, lo cual es considerado como un factor de riesgo para el desarrollo de la infección por neosporosis en canes y bóvidos (Portocarrero, Pinedo, Falcón, & Chávez, 2016), mientras que los canes seleccionados para este estudio fueron seleccionados completamente al azar, independientemente de su convivencia con hatos lecheros.

Otros estudios realizados con distintas pruebas moleculares han demostrado que en los perros que viven en granjas lecheras de Latinoamérica existe una mayor incidencia de este parásito, un ejemplo de ello es la realizada por Portocarrero *et al.*, en 388 perros que vivían en granjas junto con bovinos, este estudio utilizó la técnica de ELISA en la sangre de los canes, obteniendo como resultado que el 18.8 % presentó una infección por *N. caninum* (Portocarrero, Pinedo, Falcón, & Chávez, 2016); otro estudio es el realizado por Campo *et al.*, en 104 perros que habitaban en establos lecheros, este estudio utilizó la técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI), observando que la seropositividad ascendía hasta el 58 % en los canes estudiados (Campo, y otros, 2004); esta incidencia del 18.8 % y el 58 % obtenida en otros estudios en contraste con el 1.06 % obtenido en el presente trabajo investigativo corrobora



que la convivencia entre perros y ganado bovino es un gran factor de riesgo para el desarrollo y propagación de esta enfermedad parasitaria.



## Capítulo VI

### Conclusiones y recomendaciones

#### 4.1 Conclusiones

Al realizar el examen coproparasitario en las heces de los canes estudiados se obtuvo una prevalencia del 6 % de muestras con la presencia de estructuras compatibles con ooquistes de *N. caninum*, mientras que al realizar la prueba de PCR la frecuencia fue del 1.06 %; la única muestra que resultó positiva al realizar la prueba PCR tuvo resultado negativo al ser analizada mediante un examen coproparasitario.

Se tienen discrepancias al analizar estadísticamente los resultados obtenidos con las pruebas diagnósticas, lo que permite concluir que en el presente estudio no existe una relación entre los resultados obtenidos mediante los dos exámenes de laboratorio y que la relación entre los mismos no es estadísticamente significativa.

#### 4.2 Recomendaciones

Se ha considerado las siguientes recomendaciones, dado que en ensayo de biología molecular se encontró únicamente una muestra positiva será importante ampliar el número de muestras, en particular muestras de animales que convivan permanentemente con bovinos. Se pueda ampliar la aplicación del ensayo de PCR a muestras de sangre o líquido cefalorraquídeo de animales con sinología nerviosa compatible con Neosporosis.

Y por último, a fin de tener una mayor confianza en los ensayos de PCR incluir en los mismos un control positivo (ADN de *N. caninum* de una cepa tipo), el cual no se alcanzó a incluir en el presente trabajo.



## Capítulo VII

### Referencias bibliográficas

- Al-Qassab, Reichel, M., & Ellis, J. (2010). On the Biological and Genetic Diversity in *Neospora Caninum*. *Diversity*, 2, 411-438.
- Bulla, K., & Vanegas, P. (2015). *Identificación de neospora caninum en material fecal de 60 caninos en hatos lecheros en el Municipio El Rosal, Cundinamarca*. Bogotá: Universidad de La Salle.
- Campo, J., Chávez, A., Delgado, A., Falcón, N., Ornelas, Á., Casas, E., & Serrano, E. (2004). Frecuencia de *Neospora Canis* en perros de establos lecheros del Valle de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinaria del Perú*, 145-149.
- Casas, G., Chávez, A., Casas, E., Leyva, V., Alvarado, A., Serrano, E., . . . Puray, N. (2006). Presencia de *Neospora Caninum* en llamas de una empresa ganadera de la Sierra Central. *Revista de Investigaciones Veterinarias de Perú*, 17(1), 8-13. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v17n1/a02v17n1.pdf>
- Consejo Europeo para el Control de Parasitosis en Animales de Compañía. (2013). *Control de Protozoos Intestinales en Perros y Gatos*. Malvern Hill: ESCCAP.
- Costa, R. (2016). *Canine neosporosis: Perspectives on pathogenesis and management*. Paraná: Universidade Estadual do Norte do Paraná.
- Dalimi, A., Sabevarinejad, G. G., & Forouzandeh, M. (2014). Molecular detection of *Neospora Caninum* from naturally infected dogs in Lorestan Province, West of Iran. *Archives of Razi Institute*, 185-90.
- Delgado, A., Sandoval, R., & Montenegro, M. (Octubre de 2017). *Neosporosis bovina: un problema latente en la ganadería*. Obtenido de Actualidad Ganadera: <http://www.actualidadganadera.com/articulos/neosporosis-bovina-un-problema-latente-de-la-ganaderia.html>



- Donahoe, S., Lindsay, S., Krockenberger, M., Phalen, D., & Šlapeta, J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*, 4, 2016-238.
- Gholamreza, R. (2009). Fecal and Molecular Survey of *Neospora caninum* in Farm and Household Dogs in Mashhad Area, Khorasan Province, Iran. *Korean Journal of Parasitology*, 47(4), 417-420.
- Hill, D., Liddell, S., Jenkins, M., & Dubey, J. (2001). Specific detection of *Neospora Caninum* Oocyst in fecal samples from experimentally-infected dogs using th Polymerase Chain Reaction. *Journal of Parasitology*, 87(2), 395-398. doi:[http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395\(2001\)087\[0395:SDONCO\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1645/0022-3395(2001)087[0395:SDONCO]2.0.CO;2)
- Mainato, S. (2011). *Neosporosis Bovina*. Tesis de grado, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Cuenca, Cuenca. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3316/1/TESIS.pdf>
- Maldonado, J. (2013). *Relación entre la seroconversión positiva de vacas Holstein a Neospora Caninum y el aborto, muerte fetal temprana, momificación fetal, gestación a término y mortalidad neonatal*. Tesis de Magister en Reproducción Animal, Universidad de Cuenca, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Cuenca.
- Matín, I., García, T., Fajardo, V., Rojas, M., Hernández, P., González, I., & Martín, R. (2014). Technical Note: Detection of cat, dog, and rat or mouse tissues in food and animal feed using species-specific polymerase chain reaction. *Journal of Animal Science*, 82, 2734–2739. doi:10.2527
- McAllister, M. (2016). Diagnosis and Control of Bovine Neosporosis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 21.
- Ministerio de Salud de Perú. (2003). *Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de los parásitos intestinales del hombre*. Lima: Instituto Nacional de Salud.
- Portocarrero, C., Pinedo, R., Falcón, N., & Chávez, A. (2016). Factores de Riesgo Asociados a la Seroprevalencia de *Neospora Caninum* en





- bovidos naturalmente infectados en la Ceja de la Selva de Oxapampa, Perú. *Revista de Investigación Veterinaria de Perú*, 26(1), 119-126. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v26n1/a14v26n1.pdf>
- Ravelo, L. (2009). *Estudio clínico, serológico y coprológico preliminar de Neospora Caninum en canes de la Clínica Veterinaria Dover, Bogotá-Colombia*. Bogotá: Universidad de La Salle.
- Redacción El Tiempo. (6 de Octubre de 2017). 19.000 mascotas viven en las calles de Cuenca. *El Tiempo*. Obtenido de <http://www.eltiempo.com.ec/noticias/cuenca/2/376140/19-000-mascotas-viven-en-las-calles-de-cuenca>
- Silva, R., & Machado, G. (2016). Canine neosporosis: perspectives on pathogenesis and management. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 59-70.
- Sixtos, C. (2011). Procedimientos y técnicas para la realización de estudio coproparasitológicos. *Virbac al Día*, 1-12.
- Spencer, J., Witherow, A., & Blagburn, B. (2000). A Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction Technique that differentiates between *Neospora* species. *Journal of Parasitology*, 86(6), 1366-1368.
- Valenzuela, P. (2005). Neosporosis en bovinos y caninos. *Electronic Monographs of Veterinary Pathology*, 17-33.
- Vázquez, E. (2007). Presencia de *N. caninum* y otros parásitos gastrointestinales en perros procedentes de poblaciones de riesgo en España. *Revista de Divulgación Científica*, 1(2), 9.
- Wagner, R. (2008). *Identificación de Neospora sp. en Félidos y Cánidos Silvestres en Cautiverio en el Zoológico Jaime Duque*. Bogotá: Universidad de la Salle.
- Weber, F., Jackson, J., Sobecki, B., Chronomanski, L., Olsen, M., Meinert, T., . . . Ellis, J. (Enero de 2013). n the Efficacy and Safety of Vaccination with Live Tachyzoites of *Neospora caninum* for Prevention of Neospora-



Associated Fetal Loss in Cattle. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(1), 99-105. Obtenido de <http://cvi.asm.org/content/20/1/99.short>

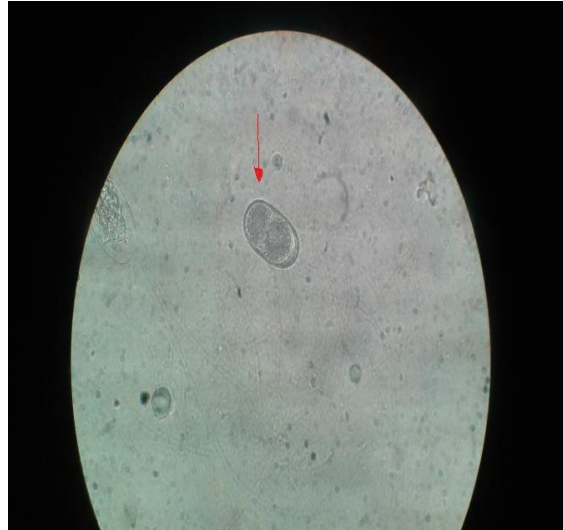
Yamage, M., Flechtner, O., & Gottstein, B. (Abril de 1996). *N. caninum*: Specific Oligonucleotide Primers for the Detection of Brain "Cyst" DNA of Experimentally Infected Nude Mice by the Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Parasitology*, 82(2), 8. Obtenido de <http://www.jstor.org/stable/3284160>



## Anexos

**Anexo 1** Fotografías de imágenes compatibles con ooquistes de *N. caninum* obtenidas a través del microscopio durante el examen coproparasitario.

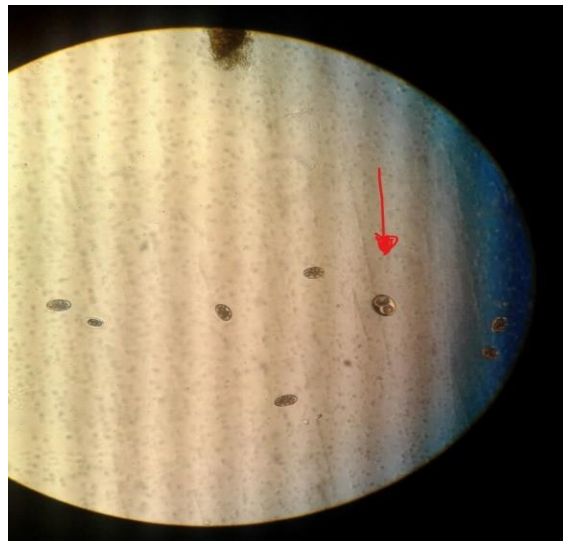
**Figura 3:** Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con *N. caninum*, muestra 27.



**Fuente:** Resultados de los exámenes realizados.

**Elaborado por:** Autor

**Figura 4:** Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con *N. caninum*, muestra 42.



**Fuente:** Resultados de los exámenes realizados.

**Elaborado por:** Autor

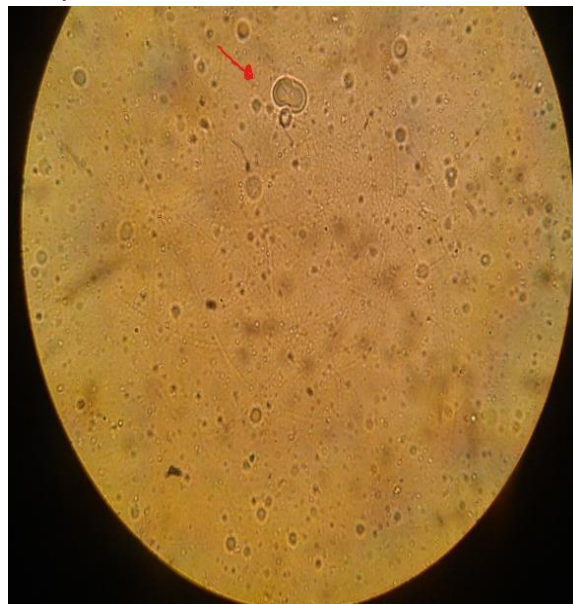


**Figura 5:** Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con *N. caninum*, muestra 54.



**Fuente:** Resultados de los exámenes realizados.  
**Elaborado por:** Autor.

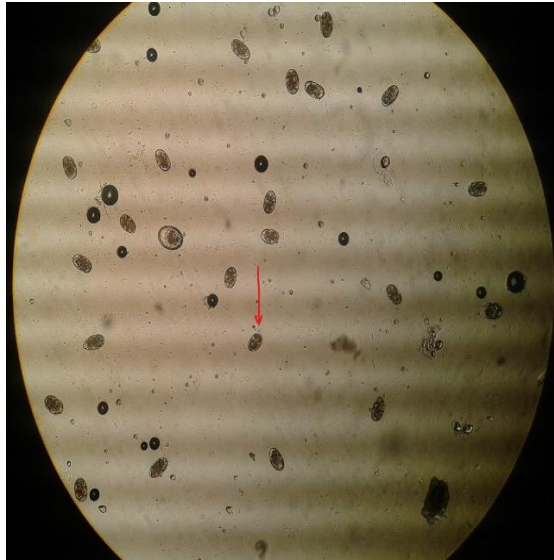
**Figura 6:** Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con *N. caninum*, muestra 68.



**Fuente:** Resultados de los exámenes realizados.  
**Elaborado por:** Autor.



**Figura 7:** Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con *N. caninum*, muestra 76.



**Fuente:** Resultados de los exámenes realizados.

**Elaborado por:** Autor.

**Figura 8:** Ooquistes parasitarios encontrados en el examen coproparasitario compatibles con *N. caninum*, muestra 83.



**Fuente:** Resultados de los exámenes realizados.

**Elaborado por:** Autor.



**Anexo 2:** Equipo de electroforesis utilizado para la realización de la prueba de PCR.

**Figura 9:** Equipo de electroforesis utilizado para la detección de *N. caninum* mediante la técnica de PCR.



**Fuente:** Laboratorio de biología Molecular-Sanidad Animal  
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca.

**Figura 10:** Gradilla para microtubos con las muestras fecales.



**Fuente:** : Laboratorio de biología Molecular-Sanidad Animal  
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca.



**Figura 11:** Equipo de electroforesis con gel de agarosa al 1,5% utilizada para el diagnóstico de *N. caninum*.



**Fuente:** Laboratorio de biología Molecular-Sanidad Animal  
Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca.



Anexo 3: Tabla de distribución Chi Cuadrado utilizada para la interpretación de resultados.

Figura 12: Tabla de contingencia para la distribución Chi Cuadrado.

...  
 ontrar un valor mayor o igual que el chi cuadrado tabulado,  $v = \text{Grados de Libertad}$

	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0
7,8794	6,6349	5,0239	3,8415	2,7055	2,0722	1,6424	1,3233	1,0742	0,8735	0,7	0,7
10,5965	9,2104	7,3778	5,9915	4,6052	3,7942	3,2189	2,7726	2,4079	2,0996	1,8	1,8
12,8381	11,3449	9,3484	7,8147	6,2514	5,3170	4,6416	4,1083	3,6649	3,2831	2,9	2,9
14,8602	13,2767	11,1433	9,4877	7,7794	6,7449	5,9886	5,3853	4,8784	4,4377	4,0	4,0
16,7496	15,0863	12,8325	11,0705	9,2363	8,1152	7,2893	6,6257	6,0644	5,5731	5,1	5,1
18,5475	16,8119	14,4494	12,5916	10,6446	9,4461	8,5581	7,8408	7,2311	6,6948	6,2	6,2
20,2777	18,4753	16,0128	14,0671	12,0170	10,7479	9,8032	9,0371	8,3834	7,8061	7,2	7,2
21,9549	20,0902	17,5345	15,5073	13,3616	12,0271	11,0301	10,2189	9,5245	8,9094	8,3	8,3
23,5893	21,6660	19,0228	16,9190	14,6837	13,2880	12,2421	11,3887	10,6564	10,0060	9,4	9,4
25,1881	23,2093	20,4832	18,3070	15,9872	14,5339	13,4420	12,5489	11,7807	11,0971	10,5	10,5
26,7569	24,7250	21,9200	19,6752	17,2750	15,7671	14,6314	13,7007	12,8987	12,1836	11,5	11,5
28,2997	26,2170	23,3367	21,0261	18,5493	16,9893	15,8120	14,8454	14,0111	13,2661	12,5	12,5
29,8193	27,6882	24,7356	22,3620	19,8119	18,2020	16,9848	15,9839	15,1187	14,3451	13,5	13,5
31,3194	29,1412	26,1189	23,6848	21,0641	19,4062	18,1508	17,1169	16,2221	15,4209	14,5	14,5
32,8015	30,5780	27,4884	24,9958	22,3071	20,6030	19,3107	18,2451	17,3217	16,4940	15,5	15,5
34,2671	31,9999	28,8453	26,2962	23,5418	21,7931	20,4651	19,3689	18,4179	17,5646	16,5	16,5
35,7184	33,4087	30,1910	27,5871	24,7690	22,9770	21,6146	20,4887	19,5110	18,6330	17,5	17,5
37,1564	34,8052	31,5264	28,8693	25,9894	24,1555	22,7595	21,6049	20,6014	19,6993	18,5	18,5
38,5821	36,1908	32,8523	30,1435	27,2036	25,3289	23,9004	22,7178	21,6891	20,7638	19,5	19,5
39,9969	37,5663	34,1696	31,4104	28,4120	26,4976	25,0375	23,8277	22,7745	21,8265	20,5	20,5
41,4009	38,9322	35,4789	32,6706	29,6151	27,6620	26,1711	24,9348	23,8578	22,8876	21,5	21,5
42,7957	40,2894	36,7807	33,9245	30,8133	28,8224	27,3015	26,0393	24,9390	23,9473	22,5	22,5
44,1814	41,6383	38,0756	35,1725	32,0069	29,9792	28,4288	27,1413	26,0184	25,0055	24,5	24,5
45,5584	42,9798	39,3641	36,4150	33,1962	31,1325	29,5533	28,2412	27,0960	26,0625	25,5	25,5
46,9280	44,3140	40,6465	37,6525	34,3816	32,3282	30,6752	29,3388	28,1719	27,1183	26,5	26,5
48,2898	45,6416	41,9231	38,8851	35,5632	33,4295	31,7946	30,4346	29,2463	28,1730	27,5	27,5
49,6450	46,9628	43,1945	40,1133	36,7412	34,5736	32,9117	31,5284	30,3193	29,2266	28,5	28,5
50,9936	48,2782	44,4608	41,3372	37,9159	35,7150	34,0266	32,6205	31,3909	30,2791	29,5	29,5
52,3355	49,5878	45,7223	42,5569	39,0875	36,8538	35,1394	33,7109	32,4612	31,3308	30,5	30,5

Fuente: [http://labrad.fisica.edu uy/docs/tabla\\_chi\\_cuadrado.pdf](http://labrad.fisica.edu uy/docs/tabla_chi_cuadrado.pdf)