

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

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA  
Neospora caninum EN BOVINOS DE TIPO LECHERO, EN LA FINCA SAN JULIÁN  
DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA”

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

POR

DONALD UBALDO JIMÉNEZ SANTIZO

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE  
MÉDICO VETERINARIO

GUATEMALA FEBRERO DE 2010

## JUNTA DIRECTIVA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: Med. Vet. LEONIDAS ÁVILA PALMA

SECRETARIO: Med. Vet. MARCO VINICIO GARCÍA URBINA

VOCAL I: Med. Vet. YERI EDGARDO VÉLIZ PORRAS

VOCAL II: Mag. Sc. M.V. FREDY ROLANDO GONZÁLEZ

VOCAL III: Med. Vet y Zoot. MARIO ANTONIO MOTTA

VOCAL IV: Br. SET LEVI SAMAYOA

VOCAL V: Br. LUIS ALBERTO VILLEDA LANUZA

### ASESORES

Med. Vet. MANUEL RODRÍGUEZ ZEA

Med. Vet. CARLOS ENRIQUE CAMEY RODAS

Med. Vet. JORGE LUIS SANDOVAL

# HORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR

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

## TITULADO

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA  
*Neospora caninum* EN BOVINOS DE TIPO LECHERO, EN LA FINCA SAN  
JULIÁN DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA”

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

PREVIO A OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

MÉDICO VETERINARIO

## TESIS QUE DEDICO:

- A DIOS: Por ser mi guía y darme la oportunidad de hacer realidad este gran sueño.
- A VIRGEN MARIA: Por hacer de mi vida mas confortable gracias a sus bendiciones.
- A MI MADRE Lilian Santizo Miranda.
- A MI HERMANA Susan Jiménez Santizo
- A MI PAIS Guatemala.
- A La Universidad de San Carlos de Guatemala, en especial a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

## **AGRADECIMIENTOS A:**

A Dios y a la Virgen María por darme el don de la vida, y permitirme culminar con sabiduría y paciencia la realización del presente estudio.

A mis padres Edgar Jiménez y Lilian Santizo por haberme dado la vida.

A mi madre Lilian Santizo, por su cariño y apoyo.

A mi hermana Susan Jiménez por su apoyo.

A mis tíos, Luis Santizo, Rosa María Santizo, Blanca Santizo, Argentina Cabrera, por su cariño y comprensión en todo momento.

Al Dr. Pablo Arroyo López, por sus sabios consejos.

A mis asesores, Dr. Manuel Rodríguez, Dr. Carlos Camey, Dr. Jorge Sandoval por sus conocimientos y experiencia para llevar a cabo este estudio.

A todos los catedráticos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, que en algún momento formaron parte de mi vida académica.

A, Sergio Guerra, José Manuel Franco, Jorge Carrera, Christian Ayala, Raúl de León, Josue Velásquez, Hamilton Barrios, Ronald Valdez, Martha Iglesias, Álvaro del Valle, Gabriela Chávez, Sergio Marroquín ( Q.E.P.D.), Gerardo Marroquín, Jorge González, Jean Paúl Rivera, por haberme apoyado en todo momento y por compartir conmigo este triunfo.

A Todos los que sin hacer mención saben de mi agradecimiento y respeto.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>II HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	5
3.1 General.....	5
3.2 Especifico.....	5
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	6
4.1 Neosporosis en Ganado Vacuno.....	6
4.1.1 Historia.....	6
4.1.2 Taxonomía.....	7
4.1.3 Morfología.....	7
4.1.3.1 Taquizoitos.....	8
4.1.3.2 Bradizoitos.....	8
4.1.3.3 Quistes .....	9
4.1.3.4 Ooquistes.....	9
4.1.4 Ciclo evolutivo.....	9
4.1.5 Epidemiología.....	10
4.1.6 Signos Clínicos.....	11
4.1.6.1 Respuesta Inmune.....	12
4.1.7 Diagnóstico.....	13
4.1.8 Tratamiento.....	14
4.1.9 Prevención.....	14
4.1.10 Control de la Neosporosis.....	15
4.1.10.1 Control de la transmisión vertical .....	15
4.1.10.2 Control de la transmisión horizontal.....	15
4.1.10.3 Control de la Neosporosis en perros.....	16
4.1.10.4 Control de la Neosporosis en vacas .....	16
<b>V. MATERIALES Y METODOS</b> .....	19
5.1 Materiales.....	19
5.1.1 Recursos Humanos.....	19
5.1.2 Reactivos .....	19
5.1.3 De laboratorio.....	19
5.1.4 De campo .....	20

5.1.5	De tipo biológico .....	20
5.1.6	Centro de referencia .....	20
5.2	Métodos.....	21
5.2.1	Área de estudio .....	21
5.2.2	Métodos de campo .....	22
5.2.3	Diseño del estudio .....	22
5.2.4	Variables a medir .....	22
5.2.5	Toma de muestra de sangre .....	23
5.2.6	Métodos de laboratorio .....	23
5.2.6.1	Procesamiento de muestras .....	23
5.2.6.2	Técnica de Elisa .....	23
5.2.6.3	Procedimiento de Elisa.....	25
5.2.6.4	Lectura e interpretación de resultados.....	26
5.2.6.5	Análisis de datos .....	27
<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>VII.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>29</b>
<b>VIII</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>30</b>
<b>IX</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>31</b>
<b>X</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>32</b>
<b>XI</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>34</b>
10.1	Tabla de Resultados No. 1 .....	35
10.2	Tabla de Resultados No. 2 .....	37
10.3	Grafica de Resultados No. 1 .....	38
10.4	Grafica de Resultados No. 2 ,3 .....	38

## I. INTRODUCCIÓN

Los parásitos internos como el protozooario *Neospora caninum* causan diferentes tipos de trastornos fisiológicos en los animales productivos, produciendo en ganadería de tipo lechero, abortos en el último tercio de la gestación, morbilidad y mortalidad neonatal, por tal motivo para el ganadero representa una pérdida considerable, tanto en forma reproductiva como también otras complicaciones clínicas; por lo tanto se hizo necesario realizar este tipo de investigaciones que redunden en una mejor sanidad animal.

En la actualidad se ha desarrollado un Kit de Elisa para el diagnóstico serológico de infección de *Neospora* en ganado vacuno, que podría ser útil en estudios epidemiológicos o en medidas de manejo y control para reducir la infección de este protozooario en el ganado. Debido a que el diagnóstico definitivo solamente puede realizarse mediante el aislamiento del organismo, esta técnica resulta ser valiosa para el caso de explotaciones con historia de abortos u otras afecciones reproductivas.

A través de esta prueba, se logrará comprobar si existe relación entre antecedentes de abortos y serología positiva a *Neospora caninum* en el ganado lechero de la finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

El siguiente trabajo de investigación se realizó con el fin de determinar si el hato lechero presenta anticuerpos circulantes a *Neospora caninum*, debido a la presencia de perros en el área, ya que éstos juegan un papel importante en el ciclo evolutivo de este parásito.

## **II. HIPÓTESIS**

“El ganado lechero de la Finca San Julián, presenta anticuerpos circulantes  
contra *Neospora caninum*”

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 General:

- Contribuir con el estudio de *Neospora caninum* en el ganado lechero de la Finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

#### 3.2 Específico:

- Determinar la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum*, por medio de la prueba de Elisa Indirecto en ganado lechero de la Finca San Julián, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 NEOSPOROSIS EN GANADO VACUNO

#### 4.1.1 HISTORIA

Esta se inicia en 1984 con un reporte de Bjerkas en Noruega de un caso de encefalitis y miocarditis en caninos, producido por un protozoario. Dubey y col en 1988 propusieron el nombre de *Neospora caninum*. En 1989 *Neospora caninum* reporta su participación como causa de aborto en bovinos y un año se demostró la transmisión transplacentaria en caninos, felinos, ovinos y bovinos. ( 1,2)

En el año de 1991 fue considerada como la mayor causa de abortos bovinos en el Estado de California. En 1993 logran reproducir la enfermedad al inocular taquizoitos en bovinos en forma experimental. (2,4)

Desde el punto de vista diagnóstico se reportó en 1991 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 amplían las herramientas diagnósticas. A pesar de los estudios realizados quedaban por definir algunos aspectos relacionados con el ciclo de vida del protozoario especialmente referentes con el huésped definitivo de la entidad, y aunque este tema fue elaborado desde 1988 por varios autores. Solamente en 1998 logran definir al perro como huésped definitivo al haber demostrado la presencia de ooquistes en materia fecal de animales alimentados con tejidos infectados de taquizoito.(1,5)

#### 4.1.2 TAXONOMÍA

Reino: Protozoa

Phylum: Apicomplexa

Clase: Sporozoea

Subclase: Coccidia

Orden: Eucoccidiidae

Suborden: Eimeriina

Familia: Sarcocistidae

Genero: Neospora

Especie: caninum (5,10)

#### 4.1.3 MORFOLOGÍA

La *Neospora caninum* se caracteriza por las estructuras y organelos dispuestos en el polo anterior de estos parásitos. Las estructuras están constituidas por los anillos polares, microtubulos internos y conoide. Este complejo apical es vital para el proceso de invasión de estos parásitos intracelulares, los últimos análisis filogenéticos ubican a *Neospora* en la familia toxoplasmatinae, que incluye otros coccidios formadores de quistes como *Toxoplasma gondii*, *Hammondia ssp.* y *Besnoitia sp.* (3,7)

Durante el ciclo de vida de *N. caninum* presenta las siguientes fases:

#### 4.1.3.1 TAQUIZOITOS

Es uno de los tres estados infecciosos de *Neospora caninum* y se encuentra en el hospedador intermedio y en forma intracelular, generalmente a nivel citoplasmático, específicamente, en la vacuola parasitófaga de la célula hospedador. Puede parasitar a un gran número de células como neuronas, macrófagos, fibroblasto, células endoteliales, miocitos. (5,6)

Los taquizoitos se dividen por endodiogénesis en forma rápida. Miden aproximadamente 7,5  $\mu\text{m}$  de longitud, tienen entre 6-16 roptries y en algunos casos presentaron entre 4-6 roptries localizados posterior al núcleo, raramente se observa un microporo. Son de forma ovoide, semilunar o globosa. (3,5)

#### 4.1.3.2 BRADIZOITOS

Los bradizoitos se dividen por endodiogénesis, en forma lenta, encontrándose dentro de los quistes tisulares. Miden aproximadamente 7-8 micras, contiene las mismas organelas que el taquizoito, pero presentan un número menor de roptries. Morfológicamente son similares a los taquizoitos. (8)

#### 4.1.3.3 QUISTES

Es un estado encontrado en el hospedador intermedio. Los quistes en el tejido son ovalados o redondos y miden hasta 107 micras de diámetro y se encuentran primariamente en el sistema nervioso central, dentro de los estos encontramos los bradizoitos aproximadamente 50 - 500. Su pared es lisa y gruesa. ( 6)

#### 4.1.3.4 OOQUISTES

No Esporulados:

Son los eliminados por los perros infectados experimentalmente, midiendo entre 11.7 a 11.3 m m de diámetro.

Esporulados:

Los ooquistes esporulados, son los que después de tres días en el medio ambiente contienen dos esporo-quistes con cuatro esporozoitos cada uno, son morfológicamente similar a los ooquistes de *T. gondii* y *Hammondia* en perro. (6,10)

#### **4.1.4 CICLO EVOLUTIVO**

El perro actúa, (tal como ocurre en el caso del gato infectado por *Toxoplasma*), como h. intermediario y h. definitivo, desarrollando las fases de reproducción asexual (merogonia) y sexual (gametogonia), respectivamente; luego de ingerir los quistes tisulares con bradizoitos (infección transversal). ( 1)

Consecuentemente en las heces los perros excretan los ooquistes inmaduros, que luego de unos pocos días esporulan y entonces están listos para infectar al bovino y a otros animales. ( 1)

En el bovino ocurre una reproducción asexual (merogonia), asintomático, pero con capacidad de infección vertical o transplacentaria, para generar patología fetal y aborto. (2)

En estos tejidos hay taquizoitos y bradizoitos, que al ser ingeridos por el perro se completa el ciclo vital. (2)

Hospedero definitivo: Los perros, estos eliminan los oocitos no esporulados. Los oocitos esporulan fuera del huésped dentro de 24 horas, dos esporocistos con cuatro esporozoitos cada uno.

Hospederos intermediarios: vacuno, Ovino, equino, Cabra, perro (3).

#### **4.1.5 EPIDEMIOLOGÍA**

La Neosporosis es reconocida como una importante causa de abortos en bovinos lecheros en distintos países del mundo. En Argentina se ha descrito la transmisión transplacentaria, siendo la prevalencia en fetos del 24,4% y del 64,5% en vacas lecheras con antecedentes de abortos. El parásito fue identificado por inmunohistoquímica en fetos abortados. (4,3)

La Neosporosis fue descrita por primera vez en Noruega en el año 1984 por Bjerkas y col., como una encefalitis y miositis de los perros causada por un esporozoo no identificado. En 1988 Dubey y col. aislaron y describieron a su agente causal, denominándolo *Neospora caninum*. En 1993 fue aislado de bovinos en California por Conrad y col.; si bien durante algún tiempo se discutió si los parásitos provenientes de perros y de bovinos eran similares, se coincidió posteriormente en su semejanza estructural y antigénica. (3,4)

Una de las vías de transmisión, es la vertical o transplacentaria. Según la etapa de la gestación en que se produce la infección, ésta podrá resultar en un aborto, muerte perinatal o en el nacimiento de una ternera infectada, lo que condicionará la permanencia de la infección en el rodeo, la otra vía de transmisión es la horizontal. (3,4)

También se ha comprobado que los perros pueden infectarse mediante la ingestión de placentas de animales infectados, que probablemente vehiculen taquizoítos o quistes de *N. caninum*. (3,7)

El perro puede presentar signos clínicos representados por parálisis y paresia, acompañados de serología positiva. Los perros provenientes de áreas rurales presentaron serología positiva en un mayor porcentaje de casos en relación con perros de áreas urbanas. Se considera que podría existir algún otro hospedador intermediario, dado el bajo número de ooquistes que en general se encuentra en las heces de perro. (3,7)

Por otra parte, se ha observado experimentalmente que algunos perros eliminadores de ooquistes no presentan anticuerpos para *Neospora caninum* ( NC), lo que hace pensar en una localización intestinal estricta del parásito, sin invasión de tejidos extraintestinales. (3)

#### **4.1.6 SIGNOS CLÍNICOS**

En vacas adultas, NC ocasiona abortos entre el tercer mes hasta el final de la gestación, aunque más frecuentemente ocurre entre el quinto y sexto mes. Se desconoce si NC ocasiona pérdidas tempranas de preñez; sin embargo, se ha descrito que mientras vacas seronegativas a la enfermedad, reciben 1.7 dosis inseminantes para quedar preñadas, las vacas seropositivas necesitaron 2.2 dosis de semen (2,3).

Así mismo, existen evidencias que vacas serorreactoras a NC son eliminadas anticipadamente por presentar un bajo desempeño reproductivo. Estos hallazgos sugieren que vacas seropositivas a NC podría resultar subfértiles.

El aborto puede producirse en pocas vacas o involucrar hasta el 30% de los animales en un rodeo. Las vacas con anticuerpos a NC 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. Aunque no es patognomónico, la momificación es un hallazgo frecuente habiéndose descrito en casos naturales y experimentales. Los terneros infectados en el útero pueden tener signos neurológicos y bajo peso al nacimiento. Más comúnmente acontece el nacimiento del ternero clínicamente normal pero crónicamente infectado. El examen clínico puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar o falta de sensibilidad propioceptiva. (2,8)

#### **4.1.6.1 RESPUESTA INMUNE**

En el primer trimestre de la gestación el feto es incapaz de reconocer al patógeno, por lo cual es vulnerable a la infección con *N. caninum* y es bastante improbable que sobreviva. En el segundo tercio de la gestación ya es capaz de montar una respuesta inmune rudimentaria, la que se evidencia por presencia de anticuerpos en el suero de fetos abortados. Esta respuesta puede no ser suficiente ya que la mayoría de los abortos ocurre en este período. Sin embargo, si la infección ocurre en el último tercio de la gestación el feto es capaz de sobrevivir y nacer infectado pero clínicamente sano. (9)

Se ha comprobado que las vacas infectadas persistentemente desarrollan una inmunidad natural protectora contra una segunda

exposición a *Neospora*. La principal respuesta inmune protectora contra infecciones de parásitos intracelulares es la respuesta mediada por células. Asociada a linfocitos T tipo 1, los cuales estimulan la producción de interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), interleuquina 12. Pero, en las vacas gestantes se produce un ambiente inmunológico bastante particular, generándose una disminución en este tipo de respuesta inmune entre los 4 y 6 meses de gestación, lo cual favorecería la multiplicación del parásito y por lo tanto, también la transmisión ( 9,10 ).

#### **4.1.7 DIAGNÓSTICO**

En esta enfermedad es necesario distinguir entre la infección clínica y subclínica. En general, si una vaca es positiva serológicamente a *Neospora* no necesariamente implica que ésta sea la causa del aborto, sino que sólo es indicativo de que ha estado expuesta a *N. caninum*. Solamente el examen histopatológico del feto abortado permite el diagnóstico definitivo de Neosporosis. Para establecer este diagnóstico, se considera una buena evidencia el hallar las lesiones características en el feto y, además, que *N. caninum* sea encontrada en dichas lesiones. Las posibles reacciones cruzadas con *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis sp.* o con otras especies Apicomplexas se pueden evitar usando Anticuerpos Monoclonales. (2,4)

Para histopatología e inmunohistoquímica (IHQ) en fetos, el ideal es contar con el feto entero para su evaluación histopatológica en busca de lesiones características. Sin embargo, en esta enfermedad no hay lesiones patognomónicas. El principal órgano afectado es el cerebro, cuya lesión típica es la presencia de encefalitis multifocal caracterizada por necrosis e inflamación no supurativa. (2,4)

#### **4.1.8 TRATAMIENTO**

En la actualidad, no hay un tratamiento efectivo para las vacas infectadas que pueda prevenir la transmisión vertical. Sin embargo, experimentos en ratones han evidenciado que el uso de los anticoccidiales derivados de la triazina, como toltrazuril y ponazuril, previenen la formación de lesiones cerebrales y además disminuye la detección de DNA parasitario por medio de PCR en más de 95%. (9,10)

Aún no existe información concluyente respecto a la eficacia de la vacuna muerta en reducir la infección fetal o abortos en vacas infectadas o en prevenir la infección post natal en vacas no infectadas. (9,10)

#### **4.1.9 PREVENCIÓN**

Existe información acerca de la sensibilidad *in vitro* de *Neospora caninum* a ciertos antibióticos; sin embargo, en la actualidad se puede afirmar que no existe un tratamiento capaz de combatir la enfermedad en bovinos, debido a la dificultad de eliminar las formas quísticas tisulares, además del elevado costo que representa el tratar rebaños con una alta morbilidad. (8,4)

Desde el punto de vista de prevención de la enfermedad en los bovinos, el uso de vacunas inactivadas es aún motivo de investigación. Pero se ha logrado una significativa reducción de la tasa de abortos en rebaños infectados, con una vacuna comercial disponible, sobre la base de parásitos muertos (*EJ. Bovilis neoguard*, Intervet), las cuales se administran de la manera siguiente:

5 mililitros por vía subcutánea durante el primer trimestre de gestación, y luego, una segunda dosis después de tres o cuatro semanas. (8,3)

En las novillas próximas al servicio se deben realizar, por lo menos dos pruebas, ya que este grupo es particularmente susceptible, debido a fallas inmunológicas. Se recomienda eliminar las hijas de las vacas seropositivas a la enfermedad, por el alto riesgo de ser congénitamente infectadas. Realizar un diagnóstico serológico en todos los animales que vayan a ingresar en la explotación. Emplear receptoras seronegativas a la enfermedad en los programas de trasplante de embriones. En el caso de que se diagnostique la enfermedad en los perros de la finca, se debe proceder a su rápido tratamiento con cualquiera de los fármacos siguientes: Trimetropina, Sulfadiazina o Clindamicina. (8)

#### **4.1.10 CONTROL DE LA NEOSPOROSIS**

##### 4.1.10.1 Control de la transmisión vertical

Controlar serológicamente a las hembras para reposición, tanto las nacidas en el hato, como a las adquiridas a otros ganaderos, dejar para reposición sólo terneras nacidas de vacas seronegativas. Si se utiliza trasplante de embriones, comprobar que las receptoras sean seronegativas. (3,8)

##### 4.1.10.2 Control de la transmisión horizontal

Evitar el acceso de perros y otros carnívoros a los potreros y recintos ganaderos, especialmente a los almacenes de alimentos, para evitar la contaminación fecal. (5)

Rápida eliminación de placentas, fetos abortados y animales muertos para evitar su ingestión por carnívoros.(5)

Desinfección de los materiales contaminados por el aborto. (5)

#### 4.1.10.3 Control de la Neosporosis en perros.

Restringir el empleo de perros al máximo manteniéndolos alojados en forma aislada en lugares con cerco para impedir la difusión de sus heces al medio ambiente. (3,5)

Impedir el acceso de perros a lugares destinados al depósito de alimento para el ganado (depósitos de granos, galpones, silos, etc.) y pasturas. Impedir que los perros entren en contacto con el ganado. Realizar el examen serológico de los perros dos veces por año a los fines de asegurarse su negatividad. (3,5)

Evitar que los perros tomen contacto con material abortado (feto, placenta) y alimentarlos con carne vacuna cocinada previamente. (3,5)

Se desconoce el rol que puedan tener los lobos , zorros, comadreas otros animales depredadores en la difusión de la enfermedad. Sin embargo, trabajos realizados en el exterior han detectado títulos a *Neospora caninum* en cánidos salvajes. (3,5)

#### 4.1.10.4 Control de la Neosporosis en vacunos

Identificación, aislamiento y serología de las vacas abortadas. Realizar un muestreo de al menos el 10% de las vacas sanas, paridas y en ordeño, dos veces por año, a los fines de conocer el nivel de infección y el riesgo de abortos. (5,8)

Cuando la seroprevalencia de la enfermedad fuere baja, podrían eliminarse las vacas reaccionantes positivas, logrando así rápidamente un rodeo libre. Sin embargo, deberá tenerse en cuenta que ante una nueva

exposición desde el medio ambiente o mediante la introducción de animales, el estatus serológico del rodeo puede revertirse por lo que deberá realizarse en seguimiento serológico al menos una vez por año. (5,8)

Trabajos seroepidemiológicos realizados en el exterior en rodeos con alta prevalencia, la sola eliminación de la vaca positiva, no logró bajar la tasa de reinfección, de manera que esta única medida de control no es suficiente y quizás económicamente, impracticable. (5,8)

Efectuar la reposición con terneras seronegativas. Lo ideal es realizar el sangrado anterior a la ingesta de calostro para no retener y criar una ternera que puede ser positiva. Esta determinación es imprescindible en tambos con infección que quieran realizar el saneamiento.

Si esta recomendación no se puede realizar, se sugiere la serología de las terneras criadas a los 5-6 meses de vida, cuando el efecto de la interferencia en la reacción serológica de los anticuerpos calostrales maternos ha desaparecido. Las terneras positivas deberán destinarse a engorde y posterior faena. (3,8)

Serología de todo bovino que ingrese al establecimiento, incluidos los animales importados en pie. (3,8)

Correcta identificación de las vacas abortadas seropositivas y de las terneras que hayan nacido anteriormente de esas vacas, para no utilizarlas en la reposición. Eliminar las vacas que abortan por segunda vez. (3,8)

Reconfirmar el mantenimiento de la preñez en el lote de vacas gestantes a los fines de detectar vacas abortadas o con mantenimiento de fetos momificados en el útero. Utilizar hembras de reemplazo seronegativas para minimizar los riesgos de infección en el rodeo (propias y/o compradas). (3)

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Materiales

#### 5.1.1 Recursos humanos

- Estudiante investigador
- Personal que trabaja en Finca San Julián, Patulul.
- Personal de Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Tres Asesores de tesis.

#### 5.1.2 Reactivos

Kit Ensayo inmunoenzimático indirecto para la detección y/o cuantificación de anticuerpos específicos frente a *Neospora caninum* en suero de ganado bovino. (PRUEBA DE ELISA)

#### 5.1.3 De Laboratorio

- Lector de ELISA
- Incubadora
- Pocillos simples
- Micropipetas uni y multicanal
- Puntal de 200 ul.
- Agua destilada
- Carretillas plásticas
- Beaker de 250 ml

- Bata
- Guantes.

#### 5.1.4 De Campo

- Hielera
- Tubos sin anticoagulante
- Jeringas
- Agujas
- Cubeta con agua
- Gasas y algodones
- Yodo
- Vehículo para el transporte de muestras
- Botas de hule.

#### 5.1.5 De tipo biológico

- Se muestreó el hato de ganado de tipo lechero de la finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Se trabajó con un total de 48 muestras de suero sanguíneo.

#### 5.1.6 Centros de referencia

- Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Internet.

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 Área del estudio

La Finca San Julián se localiza en Patulul municipio del departamento de Suchitepéquez a una distancia de 6.6 Km. de la cabecera municipal y a 124.6 Km. de la ciudad de Guatemala. Tiene como colindancias otras fincas: Norte con la Finca “Santa Cecilia”, al sur con la Finca “Las Vegas”, al este con la Finca “La Trinidad” y al oeste con las fincas “El Recuerdo” y con la Finca “San Juan Luisiana”. Cuenta con una extensión territorial de 7.88 caballerías distribuidas así: casco de la finca 2.1 Ha, ranchería 3.5 ha, potreros 142.3 Ha (dividido en 38 potreros), cafetales 109.55 Ha, callejones y caminos 11.9 ha, area deforestada 45 Ha. Cuenta con una topografía plana y ligeramente ondulada. Su zona de vida esta clasificada como bosque húmedo, subtropical cálido. Está ubicada a una altura de 425 metros sobre el nivel del mar. Su temperatura promedio anual es de 26.2°C con una temperatura máxima de 32.4°C y una mínima de 17.5°C. En la finca viven 1278 personas según el censo poblacional realizado en Marzo del 2005. Laboran en la finca 39 personas en las distintas áreas de producción, además de 4 personas que lo hacen en el área administrativa. La población animal de la finca está constituida así: 792 gallinas de postura, 51 caimanes, 22 pelibueyes, 13 caballos, 379 bovinos distribuidos así: 96 novillas, 11 novillos, 32 terneros, 63 terneras, 6 toros y 171 vacas.

El lote de ordeño se le realizó un diagnóstico de gestación el 25-2-09 y, de 48 vacas que están siendo ordeñadas, 8 están preñadas. Del lote general conformado por 154 animales hay 81 animales preñados.

### **5.2.2 Métodos de campo**

- Capacitación de personal

Se realizó una capacitación y una presentación a las personas que trabajan en la Finca San Julián, sobre esta enfermedad.

- Recopilación de datos

La investigación se inició con la recopilación de datos del lote de vacas en ordeño para ver historia de abortos, donde se realizó el presente estudio para determinar la presencia de este parásito.

### **5.2.3 Diseño del estudio**

Diseño completamente al azar.

Se muestreó bovinos hembras en producción para obtener un total de 48 muestras. Se determinó si existe anticuerpos contra *Neospora caninum* por el método de ELISA INDIRECTO.

### **5.2.4 Variables a medir**

Las variables que se midieron en esta investigación fueron, seropositividad por medio de un kit de ELISA indirecto en el suero sanguíneo, edad, y raza de cada animal del ganado en producción de la Finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

### **5.2.5 Toma de muestra de sangre**

Se realizó este procedimiento a bovinos en ordeño de la Finca San Julián. Para ello se necesitó de una limpieza o desinfección del área donde se obtuvo la muestra. Se limpió con un antiséptico y algodón o gasas, para evitar contaminaciones de la toma de sangre.

La toma de muestra se obtuvo de la vena yugular de los bovinos, se obtuvo un volumen de 3 - 5 ml por bovino sangrado, inmediatamente después se depositó en un tubo sin anticoagulante e identificado.

Este tipo de muestra por ser muy delicada, se transportó en hielera al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia lo antes posible, para su análisis.

### **5.2.6 Métodos de laboratorio**

#### **5.2.6.1 Procesamiento de las muestras de sangre en el laboratorio**

Después obtener las muestras de sangre de bovino, estas se centrifugaron en el departamento de microbiología para la obtención del suero sanguíneo.

#### **5.2.6.2 Técnica de Elisa Indirecto**

Esta es una técnica de inmunoanálisis enzimático diseñado para detectar la presencia del anticuerpo contra *Neospora caninum* en el suero. Después de centrifugada las muestras y obtención de los sueros, estas se diluyeron 1/200 y se incubaron durante 45 minutos en los pocillos sensibilizados con antígeno de *Neospora caninum*. Tras un primer lavado, se añadió un conjugado anti-IgG bovina y se incubó 30 minutos más. Después de lavar,

se añadió el sustrato y tras 15 minutos la reacción se frena el proceso, y el desarrollo de color en las placas, se lee en un lector de ELISA. El color verde en los pocillos indicó la presencia de anticuerpos específicos de *Neospora caninum*. Cuanta más alta fue la concentración de anticuerpos en la muestra de suero, más intenso se observó el color verde en el pocillo y por lo tanto mayor fue la densidad óptica.

- Lavados

Los lavados se realizaron mediante un lavador automático de placas o mediante una micropipeta que permitió dispensar la cantidad de 300 µl por pocillo. Tras las incubaciones, se realizaron los lavados según las siguientes instrucciones:

- Se eliminó el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluido entre los pocillos.
- Distribuyó unos 300 µl de solución de lavado por pocillo.
- Se agitó delicadamente la placa evitando el intercambio de material entre pocillos.
- Se volcó la placa bruscamente para vaciar su contenido.
- Antes de eliminar el contenido del último lavado, se aseguró de tener preparado el reactivo a utilizar inmediatamente. No debe mantenerse la placa en seco.
- Tras el último lavado, se sacudió la placa boca abajo sobre un papel filtro absorbente.
- Preparación de las muestras:

Se diluyeron las muestras de suero 1/200 utilizando la solución de lavado al 1x. Para ello, se añadió en un tubo 796 µl de solución de lavado 1x y 4 µl de suero. Se agitó bien para homogenizar.

### Preparación de los reactivos

- Solución de lavado: Se hizo una dilución de 1/10 en agua destilada de la solución concentrada. Una vez preparada la solución, permaneció estable durante semana se mantuvo a 4°C.
- Conjugado: Se diluyó el conjugado con solución de lavado 1x de acuerdo con la dilución indicada en el control de calidad. Se diluyó el conjugado pocos minutos antes de su uso. Cada vez que se hizo el ensayo se preparó una solución nueva.

### 5.2.6.3 Procedimiento de ELISA Indirecto

Se hizo necesario seguir los pasos que a continuación se describen:

- Se equilibraron placas, sustrato, solución de frenado y solución de lavado a temperatura ambiente.
- Se dispensaron 100 µl de solución de lavado a los pocillos para blancos (A1 y A2), 100 µl de control negativo listo para usar a otros dos pocillos (B1 y B2), 100 µl de control positivo listo para usar en C1 y C2 y 100 µl de cada muestra diluida a los restantes pocillos. Se Tapó la placa y se incubó 45 minutos a 37°C.
- Se lavó 3 veces con solución de lavado.
- Se añadió 100 µl de conjugado a cada pocillo. Tapar e incubar 30 minutos a 37°C.
- Se lavó cuatro veces la placa.
- Se añadió 100 µl de sustrato a cada pocillo, se agitó suavemente y se mantuvo la reacción durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

- Se añadió 100 µl de solución de frenado a cada pocillo en el mismo orden que se dispensó el sustrato.
- Se leyeron los valores de absorbancia a 405 nm dentro de los siguientes 15 minutos.

#### 5.2.6.4 Lectura e interpretación de resultados

- Cálculo de densidad óptica corregida (DO)
  - DO Control Positivo (DO+)

Se calculó la DO media de los dos pocillos (C1 y C2) y se restó la media de los pocillos blanco (A1 y A2).

- DO Control Negativo (DO-)

Se calculó la media de los dos pocillos (B1 y B2) y se restó la media de los pocillos blanco (A1 y A2).

- DO Muestras (DOM)

Al valor de su DO restar el valor medio de los pocillos blanco (A1 y A2).

- Cálculo del Ratio

Para obtener el ratio de muestras o controles, se divide cada DO corregida de la muestra o control (M), entre la DO corregida del control positivo (P):

- $$\text{RATIO} = \frac{DO_M - DO_B}{DO_P - DO_B}$$

- Validación del test: El test se considera válido cuándo:
  - La DO+ corregida  $\geq 0,75$
  - Ratio del control negativo  $< 0.25$
- Interpretación de resultados
  - Ratio de la muestra  $\geq 0.6$  se considera positivo.

- Ratio de la muestra  $< 0.45$  se considera negativo.
- Ratio de la muestra  $< 0.6$  pero  $\geq 0.45$  se considera dudoso.

#### **5.2.6.5 Análisis de datos**

- Los resultados se analizaron por la presencia de anticuerpos del parásito en el suero sanguíneo y los mismos se expresaron en porcentaje.
  
- Los datos se presentaron en tablas y gráficas.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo en la Finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia ubicado en el municipio de Patulul departamento de Suchitepéquez a una distancia de 6.6 Km. de la cabecera municipal y a 124.6 Km. de la ciudad de Guatemala, seleccionándose el hato bovino en producción de esta finca.

De la población de 48 animales en producción presentes en esta finca, se tomaron muestras de todo el hato lechero (Tabla No. 1), de los cuales se extrajo 4 ml de sangre por bovino, la cual fue colocada en tubos sin anticoagulante, ya que para este tipo de prueba es indispensable la obtención del suero sanguíneo.

De los 48 animales bovinos en producción muestreados, 14 fueron positivos a anticuerpos de *Neospora caninum* (tabla No. 1 y 2), representando el 29.16% de la población total muestreada y los otros 34 animales en producción representan el 70.84% del total de la población muestreada.

El rango de edad con mayor presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* fue de tres a cinco años de edad.

## VII. CONCLUSIONES

- 1) La presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en el hato bovino en producción de la Finca San Julián obtenidos por medio de la prueba de ELISA indirecto es del 29.16%.
- 2) El kit de ELISA indirecto demostró apropiadamente la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* en el hato en producción de dicha finca.
- 3) La presencia de perros de vaquería en el área donde se realizó este trabajo de investigación, es la responsable de Neosporosis en vacas en producción.
- 4) La edad de los bovinos afectados por esta enfermedad es más frecuente entre los tres y cuatro años de edad en la Finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

- 1) Que se implemente el uso de Kit de Elisa indirecto como prueba de rutina en los hatos lecheros para determinar si existe la presencia de anticuerpos contra la Neosporosis en los bovinos en producción.
- 2) Que se continúe con las pruebas periódicas de otras enfermedades infecciosas que provoquen aborto en vacas en producción con el fin de descartar otras entidades confundibles con Neosporosis.
- 3) Realizar desparasitaciones a los perros de vaquería, ya que éstos actúan como hospederos definitivos de la Neosporosis y evitar así que estos propaguen la enfermedad a los bovinos.

## IX. RESUMEN

El presente estudio se llevó a cabo en la Finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia ubicada en el municipio de Patulul departamento de Suchitepéquez a una distancia de seis punto seis Km. de la cabecera municipal y a ciento veinte y cuatro punto seis Km. de la ciudad de Guatemala, seleccionándose el hato bovino lechero en producción.

El propósito de este estudio fue generar información de la presencia del protozoo *Neospora caninum* y la importancia que tiene en la reproducción bovina, ya que ocasiona aborto desde el 3er. mes hasta el final de la gestación produciendo pérdidas considerables para esta unidad productiva.

Por medio de un kit de ELISA indirecto se logró determinar que el hato lechero presenta anticuerpos circulantes a *Neospora caninum*, la causa es la presencia de perros de pastoreo en el área, ya que éstos como hospedero intermediario y definitivo juegan un papel importante en el ciclo evolutivo de este parásito.

De los 48 bovinos en producción muestreados, 14 fueron positivos a anticuerpos contra *Neospora caninum*, (Tabla No. 1, 2) representando el 29.16% de la población total muestreada y los otros 34 animales en producción fueron negativos lo que representa el 70.84% del total de la población muestreada.

Los resultados obtenidos indican que los perros de vaquería, la falta de higiene e instalaciones inadecuadas donde los animales en producción puedan tener a sus crías, predisponen al apareamiento de Neosporosis en vacas en la Finca San Julián propiedad de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala

## BIBLIOGRAFÍAS.

1. A Haddad , JP; Dohoo, I; Vanleween, A. 2005. A Review of Neospora caninum in Dairy and Beef Cattle – a Canadian Perspective ( en línea). Ontario, Canada, Canadian Veterinary Medical Association, marzo del 2005 Consultado 13 ago. 2009.  
Disponible en. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1082867>
2. Barr, B; Anderson, M; Severlow, K; Conrad P.1995. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. Vet. Rec. ; Dec.137: 611-613.
3. Dubey, JP; Beattie, CP. 1988. Toxoplasmosis of animals and Man Boca Raton Florida, US, CRC Press Inc. s.p.
4. Einstock, D. 1999. Neospora Caninum ( en línea ). Pennsylvania, US, Departamento of Veterinary Science, College Of Agriculture, Pennsylvania State University, State College, PA, Pennsylvania US, Junio de 1999. Consultado 13 ago. 2009. Disponible en <http://www.cas.psu.edu/docs/CASDEPT/VET/NEOSPORA.H TM>
5. Lindsay, D; Debuey, J; Blagburd, B. 1996. Finding the cause of parasite induced abortions in cattle; Jan. Veterinary Medicine: 64-71.
6. Muñoz Hernández, Al. 2004. Puesta a punto de la Técnica en Cadena de las Polimerasas (PCR), Para el Diagnostico de Neospora caninum en tejido nervioso central de bovinos abortados (en línea). Temuco, Chile, Universidad Católica de Temuco, Chile Agosto del 2004 Consultado 13 ago. 2009.

Disponible en <http://biblioteca.uct.cl/tesis/andrea-muñoz/tesis.pdf>

7. **Patitucci, A; Pérez, M; Cárcamo, C; Baeza, L. 2004.** Presencia de anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en equinos en Chile. Arch Med Vet; 36: 203-206.
8. \_\_\_\_\_; **Pérez, M; Luders, C; Ratto, M; Dumont, A. 1999.** Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en rebaños lecheros del sur de Chile. Arch Med Vet; 31: 215-218.
9. Venturini, MC. 2003. Neosporosis epidemiología y diagnostico (en línea ). La Planta, Argentina Lab. De Inmunoparasitología, Facultad de C. Veterinarias, UNLP, septiembre del 2003. Consultado 13 ago. 2009.  
Disponible en [http://cnia.inta.gov.ar/helminto/resúmenes/rtandil\\_04.htm](http://cnia.inta.gov.ar/helminto/resúmenes/rtandil_04.htm)
10. **Neospora caninum – Parasitología - Monografias.com** s.f.  
La literatura mundial es cada día más abundante y coincidente sobre la importancia que tiene **Neospora caninum** como causa de aborto en bovinos. (en línea). Consultado 13 ago. 2009.  
Disponible en [www.monografias.com/.../neospora-caninum/neospora-caninum.shtml](http://www.monografias.com/.../neospora-caninum/neospora-caninum.shtml)

# **ANEXOS**

Tabla No. 1 Ficha clínica de resultados y variables que se tomaron en cuenta del hato lechero en producción en la Finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

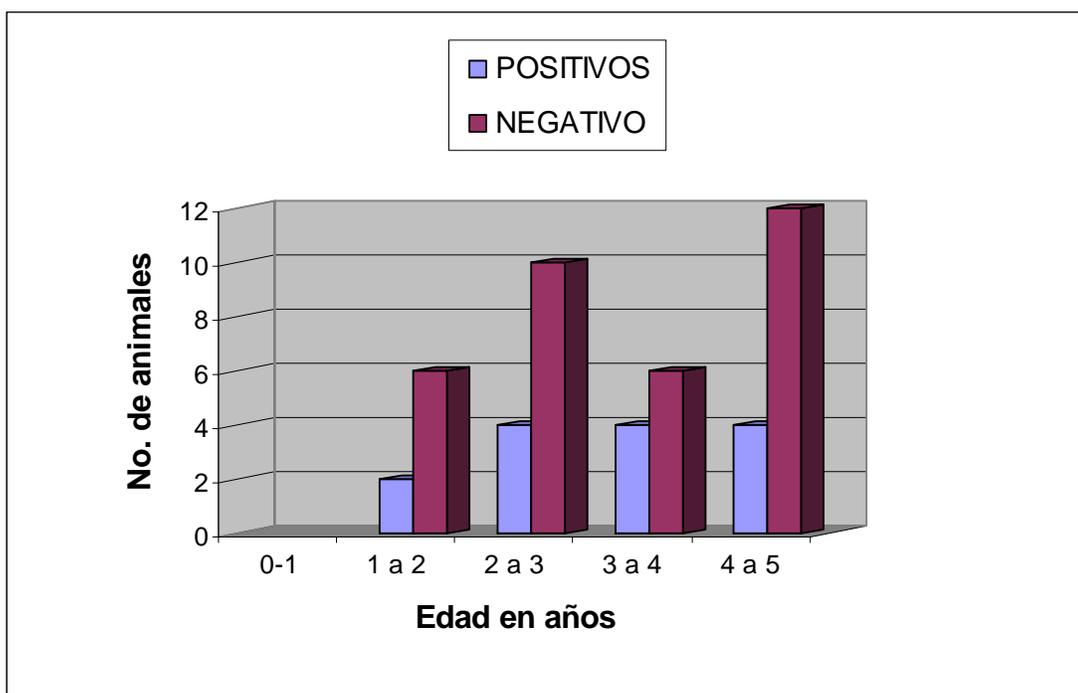
Correlativo	Identificación animal	Raza	Edad	Resultados
1	531	Holstein + pardo suizo	2.5 años	-
2	4-55	Pardo suizo	1-5 años	-
3	4-136	Gyr lechero + criollo	5 años	-
4	4-120	Criollo	5 años	-
5	3-60	Criollo + pardo suizo	3.5 años	-
6	3-36	Holstein + gyr lechero	2 años	-
7	3-11	Holstein	2.5 años	-
8	408	Criollo + Holstein	5 años	-
9	4-73	Criollo + Holstein	5 años	-
10	Toro 5	Criollo	4 años	-
11	436	Holstein + pardo suizo	6 años	+
12	642	Holstein + pardo suizo	3 años	-
13	4-07	Holstein + pardo suizo	2 años	-
14	4-04	Holstein + pardo suizo	3.5 años	+
15	2-63	Holstein + pardo suizo	3.5 años	+
16	4-30	Holstein + pardo suizo	3 años	-
17	528	Pardo + criollo	3 años	-
18	6-78	Pardo + criollo	4.5 años	-
19	1-23	Pardo suizo + criollo	2 años	-
20	6-89	Gyr lechero + criollo	3.5 años	-
21	4-43	Criollo	3.5 años	+
22	5-124	Criollo + pardo	3 años	-
23	443	Gyr lechero + criollo	5 años	-
24	514	Criollo	3.5 años	-
25	618	Criollo + pardo suizo	2 años	-
26	2J	Gyr lechero + criollo	2.5 años	-
27	4-71	Criollo	5 años	+

28	523	Criollo + pardo suizo	5 años	-
29	4-99	Pardo suizo + criollo	4 años	-
30	609	Pardo suizo + criollo	2.5 años	+
31	1-84	Pardo suizo + criollo	1-5 años	-
32	1-29	Pardo suizo + criollo	5 años	-
33	4-42	Pardo suizo + criollo	5 años	-
34	534	Pardo suizo + criollo	4 años	+
35	3-68	Pardo suizo + criollo	5 años	+
36	2-85	Pardo suizo + criollo	3 años	-
37	6-105	Pardo suizo + criollo	3 años	-
38	6-02	Pardo suizo + criollo	5 años	-
39	522	Pardo + gyr	5 años	-
40	6-58	Pardo suizo + gyr lechero	5 años	+
41	5-95	Pardo suizo + gyr lechero	2.5 años	+
42	450	Pardo suizo + gyr lechero	5 años	+
43	6-21	Pardo suizo + gyr lechero	5 años	-
44	83	Pardo suizo + gyr lechero	1.5 años	+
45	4-112	Pardo suizo + gyr lechero	1.5 años	-
46	0-39	Pardo suizo + gyr lechero	2.5 años	+
47	5-131	Gyr lechero	2.5 años	+
48	4-18	Gyr lechero	2.5 años	-

TABLA No. 2 Resultados de los bovinos en producción muestreados expresados en porcentaje en finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Año 2009

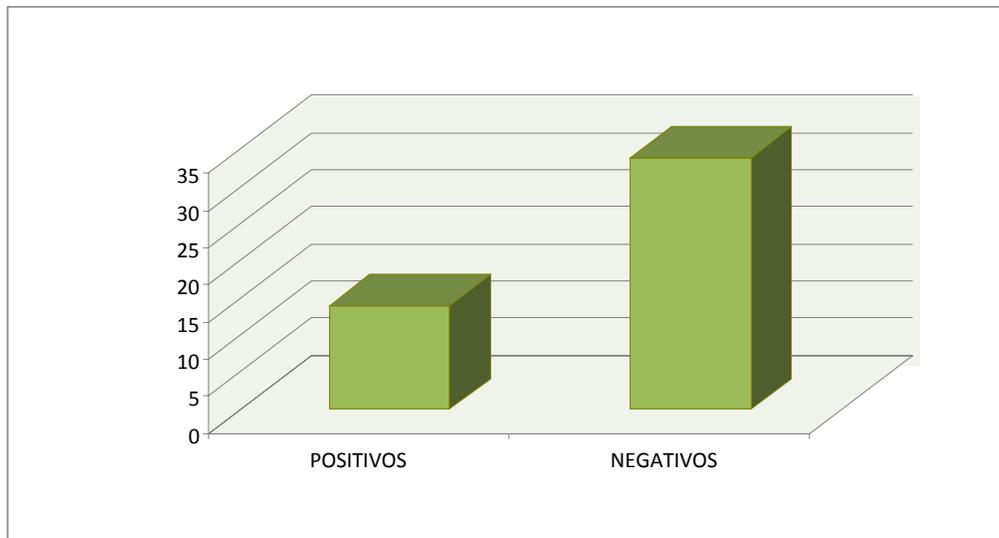
Resultados		%
Positivos	14	29.16
Negativos	34	70.84
Total muestreados	48	100 %

GRÁFICA No. 1 Distribución de la frecuencia de animales positivos y negativos en el diagnóstico de anticuerpos circulantes contra *Neospora caninum* en finca San Julián de la Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia. Año 2009

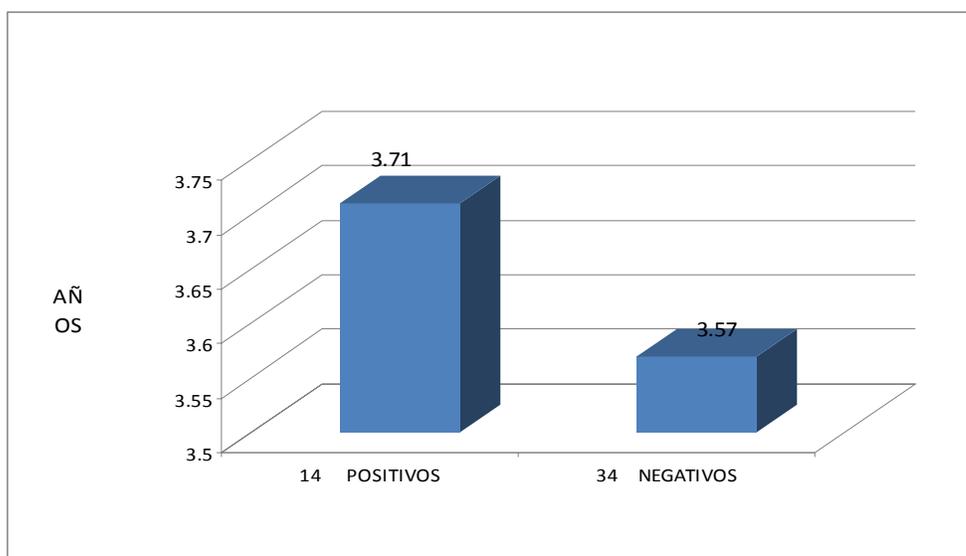


Fuente: Investigación de campo.

GRÁFICA No. 2 Resultados totales de bovinos en producción en base a negatividad y positividad en Finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Año 2009



GRÁFICA No. 3 Promedio de edad de negativos y positivos de los bovinos muestreados en producción en la Finca San Julián de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Año 2009



Fuente: Investigación de campo.

