UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS
Laureate International Universities®

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

"DETERMINACIÓN SEROLÓGICA DE *NEOSPORA CANINUM* EN PACIENTES CANINOS DE DOS CLÍNICAS VETERINARIAS AL NORTE DE QUITO."

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Profesor Guía:
Freddy Proaño Pérez, Ph.D.

Autora:
Diana Carolina Recalde Salazar

Año:
2013

DECLARACIÓN DE PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

……..

Freddy Proaño Pérez, Ph.D.
Médico Veterinario Zootecnista
C.I.: 1002081162

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

"Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes".

……..

Diana Carolina Recalde Salazar
C.I.: 172269171-2

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, en especial a mis padres por haber creído en mí y haberme brindado su apoyo incondicional todos estos años.

A los propietarios de los pacientes por su entera colaboración al facilitar la realización de esta tesis.

A mi director de tesis el Dr. Freddy Proaño por el apoyo incondicional que me ofreció en todo momento.

Al Laboratorio Livexlab por su apoyo para la adquisición y realización de los análisis del laboratorio.

Al Dr. Patricio Jara y al Dr. Roberto Rueda por permitirme muy comedidamente realizar el muestreo en sus establecimientos veterinarios.

No hubiera hecho nada sin el apoyo de todas estas personas….

Muchísimas gracias a todos!

DEDICATORIA

Este trabajo, se lo dedico a mi familia entera, por su apoyo incondicional, constante, paciencia y comprensión que tuvieron conmigo.

Son ellos mi razón de vivir y quienes me impulsaron e inspiraron a la culminación de esta etapa tan esperada en mi vida.

RESUMEN

La Neosporosis canina es una enfermedad que lastimosamente es subdiagnosticada y muchas veces confundida con otras enfermedades neurológicas. Esta enfermedad clínicamente afecta a los caninos de todas las edades pero con mayor énfasis a cachorros y gerontes, la infección se puede transmitir de forma horizontal por contacto directo y vertical de forma intrauterina.

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de *Neospora caninum* en perros mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en dos Clínicas Veterinarias del Distrito Metropolitano de Quito, con el fin de evaluar y analizar las posibles formas de contagio.

En total, se incluyeron 100 caninos en el estudio, los cuales fueron distribuidos en dos grupos: Grupo A (Hospital Veterinario "Mascotas") n=75 y Grupo B (Clínica Veterinaria "Perros y Gatos") n=25, usando los siguientes parámetros: procedencia; entorno; genero; sin distinción de edad; sin distinción de raza; signología neurológica compatible; uso glucocorticoides; contacto con bovinos; abortos y tipo de alimentación.

Las muestras fueron analizadas mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta, determinando IgG en el laboratorio LIVEXLAB. Adicionalmente, se aplicó una encuesta a los propietarios de mascotas muestreadas para obtener información necesaria para evaluar ambiente y forma de vida de las mismas.

Como resultado, se encontró un total del 6% de seropositivos en el estudio, distribuidos: grupo A 5% y grupo B 1%; se sugiere como factores de riesgo la edad, la raza, ambiente y uso de glucocorticoides, de acuerdo al análisis comparativo realizado.

En conclusión, este el estudio se identificó un grupo de caninos seropositivos, lo que demuestra que la enfermedad podría estar difundida en un importante grupo de la población canina que se encuentran en riesgo de la enfermedad.

Palabras Clave: Neospora caninum, Neosporosis canina, IgG, Inmunofluorescencia indirecta, afecciones neuromusculares.

ABSTRACT

Serological determination of Neospora caninum in patients canines in two veterinary clinics in north of Quito

Neosporosis in dogs is a misdiagnosed disease that, unfortunately, is frequently confused with other neurological diseases. This disease affects canines in all ages, but with more emphasis in poppies and old dogs, transmitted mainly by two ways, horizontal and vertical.

The objective of this study was to determine the presence of Neospora caninum in dogs by using indirect immunofluorescence test (IIF). All samples were taken in two veterinarian clinics located on Metropolitan District of Quito, and the results were evaluated in order to identify any possible risk factors of infection.

The total of 100 canines that were tested, were distributed within two groups: Group A (Veterinarian Hospital “Mascotas”) with a sample of 75 canines, and Group B (Veterinarian Clinic “Perros y Gatos”) with a sample of 25 canines. The following parameters were used: origin; environment; gender; without distinction of age; without distinction of races; neurological signology; use of glucocorticoid; contact with cattle; abortions and type of food.

Samples were analyzed by indirect immunofluorescence test, by determining IgG in the laboratory LIVEXLAB. A questionnaire survey was also applied to the owners of pet’s samples, to obtain more information; which was needed to determine the environment and lifestyle of the dogs tested.

The results revealed 6% of seropositive canines, distributed 5% in group A, 1% in group B. According to the comparative results, were suggested as risk factors of the disease: age, breed, environment, and use of glucocorticoid.

In conclusion, this study identified a group of seropositive canines, which showed that the disease could be dissipated in an important group of the canine population at risk of infection.

Key words: Neospora caninum, Neosporosis canine, IgG, indirect immunofluorescence, neuromuscular affections.

ÍNDICE

CAPÍTULO I 1
1.1 Introducción 1
1.2 Antecedentes 2
1.3 Objetivos 4
1.3.1 Objetivo General 4
1.3.2 Objetivos Específicos 5

CAPÍTULO II 6
2. REVISIÓN LITERARIA 6
2.1 Historia 6
2.2 Etiología 8
2.3 Morfología del parásito 10
2.4 Biología del parásito 14
2.4.1 Rango de hospedadores 14
2.4.2 Ciclo biológico 14
2.4.3 Resistencia a factores bióticos y abióticos 19
2.5 Epidemiología 20
2.5.1 Hospedero 20
2.5.2 Agente Etiológico 21
2.5.3 Ambientes 29
2.5.4 Distribución Geográfica 29
2.5.5 Transmisión 31
2.6 Patogenia 33
2.6.1 Signos Clínicos 34
2.6.2 Lesiones Histopatológicas 39
2.6.3 Respuesta Inmunológica 39

2.7 Diagnóstico 46
2.7.1 Clínico 46
2.7.2 Laboratorio 46
2.7.3 Alteraciones en Hematología y Bioquímica 52
2.8 Prevención 53
2.8.1 Inmuprofilaxis 54
2.9 Control 56
2.9.1 Control de la transmisión vertical 56
2.9.2 Control de la transmisión horizontal 56
2.9.3 Control de la Neosporosis en caninos 56
2.9.4 Control de la Neosporosis en bovinos 57
2.10 Tratamiento 58
2.11 Aspectos en la Salud Pública (Zoonosis) 59

CAPÍTULO III 61
3. MATERIALES Y MÉTODOS 61
3.1 Diseño de Estudio 61
3.1.1 Ubicación 61
3.2 Materiales 61
3.2.1 De Campo 61
3.2.2 De Laboratorio 63
3.3 Métodos 64
3.3.1 De Campo 64
3.3.2 De Laboratorio 67
3.4 Análisis Estadístico 69
3.4.1 Variables del Estudio 69
3.4.2 Método Estadístico 70

CAPÍTULO IV 77
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 77
4.1 Resultados de los cálculos estadísticos descriptivos de Neospora caninum según las variables seleccionadas. 77
4.2 Distribución de los resultados generales del análisis de laboratorio 78
4.3 Seroprevalencia de Neospora caninum según el lugar de estudio 80
4.4 Seroprevalencia de Neospora caninum según la procedencia 81
4.5 Seroprevalencia de Neospora caninum según el entorno 82
4.6 Seroprevalencia de Neospora caninum según la edad 83
4.7 Seroprevalencia de Neospora caninum según el género 84
4.8 Seroprevalencia de Neospora caninum según la raza 85
4.9 Seroprevalencia de Neospora caninum según signos neurológicos 90
4.10 Seroprevalencia de Neospora caninum según el tipo de alimentación 91
4.11 Seroprevalencia de Neospora caninum según uso de glucocorticoides 92
4.12 Seroprevalencia Neospora caninum según la convivencia con animales domésticos 94
4.13 Seroprevalencia de **Neospora caninum** según la presencia de abortos 95
4.14 Determinación de la prevalencia 95
4.15 Determinación de la prevalencia real 96
4.16 Determinación del Chi Cuadrado $x2$ 96
4.17 Determinación del Valor predictivo 96

4.18 Casos clínicos 97

CAPÍTULO V 103

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 103

5.1 Conclusiones 103

5.2 Recomendaciones 104

REFERENCIAS 106

ANEXOS 116

CAPÍTULO I

1.1 Introducción

En la práctica clínica de medicina de animales menores, a diario se atienden pacientes que provienen de zonas rurales, zonas urbanas, del exterior u originarios del Distrito Metropolitano de Quito, en donde existen una serie de enfermedades de tipo infeccioso o parasitario, las cuales pueden transmitirse entre ellos.

Una de estas enfermedades que se considera emergente y que puede estar sub-diagnosticada, es la Neosporosis canina, la cual a menudo es confundida con otras enfermedades infecto-contagiosas o parasitarias, principalmente aquellas que ocasionan problemas de tipo nervioso como el Distemper y Toxoplasmosis (Flores Yánez, 2006, pp. 6-16). Esta enfermedad es considerada de gran importancia económica en la ganadería ya que es una causa importante de abortos en los bovinos.

En la actualidad, no existe un control de especies que están en contacto con el ganado, entre ellas los caninos. A pesar de que el canino es parte fundamental en el ciclo biológico del parásito, no hay un esquema de exámenes parasitológicos que incluya Neospora caninum, esto ayudaría a disminuir la propagación de caninos infectados y así evitar pérdidas económicas en la producción ganadera, áreas donde se mantienen estas dos especies.

La presente investigación, pretende convertirse en un estudio de referencia para identificar este problema y servirá como información válida y de apoyo a profesionales, autoridades competentes y propietarios interesados en la situación actual de la Neosporosis canina en las mascotas, a través de la determinación de anticuerpos mediante la aplicación de una prueba diagnóstica específica: Inmunofluorescencia indirecta (IFI), y así justificar la inclusión de Neospora caninum en el esquema de control parasitológico

1.2 Antecedentes

La neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo Neospora caninum, que produce alteraciones neuromusculares en los caninos, y abortos o mortalidad neonatal en los bovinos (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En Noruega, en el año 1984 se dio el primer indicio de la existencia del N. caninum, en donde se describe una enfermedad neurológica en caninos, que presentaba procesos de miositis y encefalitis. Las lesiones observadas, indicaban y mostraban un agente similar al Toxoplasma gondii, sin embargo los animales afectados no presentaban anticuerpos contra este parásito (Martínez Contreras, 2012, pp. 49-66).

En 1988, logran aislar a N. caninum de 10 caninos con alteraciones neurológicas, lo describen como un protozoo y lo ubican dentro de la Familia Sarcocystidae (Cornejo Prado, 2004, pp. 1-18). A este género también pertenece la especie Neospora hughesi, encontrada en caballos el cual presenta diferencias moleculares que lo distinguen del N. caninum (Granillo y Martínez, 2008, pp. 1-32).

Posteriormente en 1988, se aisló e identificó y fue denominado Neospora caninum (Patitucci, Phil y Pérez, 2001, pp. 227-232), obtuvieron el primer aislado de N. caninum en cultivo celular y en ratones a partir de muestras de cerebro y músculos de origen canino (Álvarez García, 2003, pp. 2-85). La obtención del primer aislado de N. caninum permitió el desarrollo de una prueba de IFI, y un año más tarde, Dubey y Lindsay (1989b, pp. 1578-1579) desarrollaron una prueba de inmunohistoquímica para la detección en tejidos de animales infectados (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

A comienzos de la década de los 90, Anderson y otros (1991, pp. 241-244) y Barr, Anderson, Dubey y Conrad (1991a, pp. 110-116) reconocieron a la neosporosis como la principal causa de aborto en el ganado lechero de

California, hecho que fue apoyado por los resultados obtenidos por diferentes grupos investigadores de otros países (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En el año 1998, McAllister y otros (1998, pp. 1473-1478) describieron al canino como el hospedador definitivo de N. caninum, cerrando de este modo, el ciclo biológico (Álvarez García, 2003, pp. 2-85). En cuanto a los caninos, la enfermedad puede ser fatal tanto en jóvenes como en adultos, pero, los casos de infección congénita son los más dramáticos. En cachorros la manifestación clínica característica de la neosporosis es la paresia y/o la parálisis ascendente de los miembros posteriores, con contracción espástica de los mismos (Patitucci et al., 2001, pp. 227-232).

En el Ecuador la enfermedad no ha sido estudiada a profundidad, por lo tanto no existen medidas profilácticas. En las producciones ganaderas lamentablemente no hay un amplio conocimiento sobre este parásito por esta razón las mascotas están en contacto directo con los bovinos y facilitando su contagio. En las clínicas veterinarias de especies menores en el Distrito Metropolitano de Quito, no hay un control minucioso de mascotas con riesgo de infección a pesar de que es una enfermedad de distribución mundial.

Desafortunadamente en el Distrito Metropolitano de Quito no existen investigaciones en caninos sobre este tema, sólo se ha encontrado una investigación en bovinos realizada en la zona centro norte de la sierra por Lozada (2004, pp. 1-85) de la Universidad Central del Ecuador, en donde se trabajó con 395 muestras y resultó que el 42% eran animales seropositivos, se conoce que el canino juega un rol muy importante en el ciclo de vida del parásito, siendo este el huésped y principal foco de infección, la forma de contagio más común es a través de las heces, cuando los bovinos ingieren pasturas contaminadas, provocando abortos y muerte neonatal, lo cual es de gran importancia el control en el medio (Pabón Valverde, 2007, pp. 11-32).

En cuanto al control existe una vacuna para evitar los abortos en bovinos, lamentablemente no demuestra una inmunidad efectiva, en cuanto a los

caninos hay un tratamiento medicamentoso, por lo que se necesita desarrollar más investigación sobre esta patología y un análisis de la actual situación de nuestras mascotas.

Es indispensable determinar la presencia y estimar la prevalencia de esta patología en la ciudad, ya que se desconoce estos parámetros al no haber estudios realizados en caninos. El presente estudio busca servir de base para el desarrollo de otras investigaciones en todas las zonas posibles y conocer la prevalencia total de la ciudad.

Con esto proponer que en las clínicas veterinarias y los propietarios de criaderos se incluya a N. caninum como un diagnóstico diferencial de enfermedades neurológicas y así realizar un control más minucioso en todos los pacientes que a diario se presentan en consulta externa, tanto los nacidos en el Distrito Metropolitano como los pacientes trasladados de la cuidad al campo o viceversa, de importación y animales que vivan con ganado o tengan contacto esporádico que probablemente podrían portar N. caninum.

Con esta propuesta se pretende contribuir con información útil para el manejo y control de las mascotas que porten este parásito, se utilizarán las técnicas probadas y específicas para identificar al parásito en las mascotas de la ciudad, aportando de esta manera al avance del conocimiento diagnóstico y terapéutico en cuanto a la clínica de especies menores y así evitando problemas futuros a la producción ganadera.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Determinar la presencia de Neospora caninum en perros mediante la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) en dos Clínicas Veterinarias del Distrito Metropolitano de Quito.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar la presencia de anticuerpos específicos anti- Neospora caninum en muestras serológicas de perros con y sin signología compatible con la enfermedad mediante la prueba IFI (Inmunofluorescencia indirecta).

- Evaluar los resultados del grupo de estudio y determinar los factores de riesgo al compararlos con la información de la procedencia; entorno; sexo; edad; raza; signología neurológica compatible; uso glucocorticoides; contacto con bovinos; abortos y tipo de alimentación.

- Justificar y sugerir la inclusión de Neospora caninum en el esquema de diagnóstico parasitológico especialmente en mascotas importadas en clínicas veterinarias y criaderos caninos, para establecer un tratamiento adecuado y proponer medidas de control de la Neosporosis a los propietarios de estas mascotas.

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN LITERARIA

2.1 Historia

En 1984, se describió por primera vez un protozoo semejante a Toxoplasma gondii, el cual provocó encefalomielitis y miositis en siete caninos noruegos, de los cuales ninguno presentó anticuerpos contra T. gondii. En la misma época, en un estudio retrospectivo realizado en U.S.A. por Dubey, Carpenter, Speer, Topper y Uggla (1988a, pp. 1269-1285) se identificó un coccidio formador de quistes, asociado con una enfermedad neurológica severa en 10 de 23 caninos analizados (Patitucci et al., 2001, pp. 227-232).

Posteriormente en 1988, el parásito se aisló e identificó y fue denominado N. caninum (Patitucci et al., 2001, pp. 227-232), obtuvieron el primer aislado de N. caninum en cultivo celular y en ratones a partir de muestras de cerebro y músculos de origen canino (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

La obtención in vitro del primer aislado de N. caninum permitió el desarrollo de una prueba de IFI para el diagnóstico serológico de la neosporosis y, un año más tarde, Dubey y Lindsay (1989b, pp. 1578-1579) desarrollaron una prueba de inmunohistoquímica para la detección del parásito en tejidos de animales infectados (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Simultáneamente, Speer y Dubey (1989, pp. 458-463) realizaron estudios sobre la ultra estructura de los taquizoítos, bradizoítos y quistes tisulares (Álvarez García, 2003, pp. 2-85); Thilsted y Dubey (1989, pp. 205-209) describieron, por primera vez, a N. caninum como agente etiológico de abortos en el ganado bovino (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

A partir de ese momento, las diferentes líneas de investigación centraron sus esfuerzos en estudiar los mecanismos de patogenicidad del parásito en

diferentes modelos animales naturales y experimentales, así como en determinar las repercusiones de esta parasitosis en el ganado bovino mediante la realización de numerosos estudios de prevalencia en diversos países de todo el mundo (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los primeros estudios sobre los mecanismos de transmisión de N. caninum realizados por Lindsay y Dubey (1990a, pp. 177-179; Lindsay y Dubey, 1990b, pp. 410-413) pusieron en manifiesto la importancia de la transmisión vertical del parásito y establecieron un modelo experimental en el ratón para el estudio de la patogenia de la infección (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

A comienzos de la década de los 90, Anderson y otros (1991, pp. 241-244); Barr y otros (1991a, pp. 110-116) reconocieron a la neosporosis como la principal causa de aborto en el ganado bovino lechero de California, hecho que fue apoyado por los resultados obtenidos por diferentes grupos investigadores de otros países (Álvarez García, 2003, pp. 2-85). Desde entonces, se han multiplicado los estudios para la obtención y caracterización de diversos aislados de N. caninum, no solo de origen canino sino también bovino (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Con el paso del tiempo se han desarrollado nuevas pruebas diagnósticas indirectas, como el enzimoinmunoensayo (ELISA), la prueba de aglutinación directa y el western blot; y directas como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo la PCR cuantitativa (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En el año 1998, se pusieron en evidencia dos de los aspectos más desconocidos de la neosporosis. Por una parte, McAllister y otros (1998, pp. 1473-1478) describieron al canino como el hospedador definitivo de N. caninum, cerrando de este modo, el ciclo biológico de N. caninum. Por otra parte, Marsh y otros (1996, pp. 1907-1913; Marsh, Barr, Packham y Conrad, 1998, pp. 983-991) propusieron una nueva especie dentro del género Neospora, N. hughesi, la cual originaba trastornos neurológicos en los caballos

(Álvarez García, 2003, pp. 2-85). N. hughesi fue aislada a partir de tejido nervioso de un caballo adulto que presentaba sintomatología nerviosa (Marsh et al., 1996, pp. 1907-1913; Marsh et al., 1998, pp. 983-991). Posteriormente, diversos autores pusieron en evidencia las diferencias ultra estructurales, antigénicas, genéticas y de patogenicidad existentes entre esta nueva especie y N. caninum. Sin embargo, la información disponible sobre la biología de N. hughesi es muy escasa (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En cuanto a los caninos la enfermedad puede ser fatal tanto en caninos jóvenes como adultos, pero los casos de infección congénita son los más dramáticos. En cachorros la manifestación clínica característica de la neosporosis es la paresia y/o la parálisis ascendente de los miembros posteriores, con contracción espástica de los mismos (Patitucci et al., 2001, pp. 227-232).

2.2 Etiología

Tabla No1. Taxonomía y características biológicas de N. caninum.

Clasificación	Nombre	Características Biológicas
Reino	Protozoo	Animal microscópico unicelular
Phylum	Apicomplexa	Formas invasivas con complejo apical
Clase	Sporozoa	Locomoción de formas invasivas mediante movimientos de flexión, ondulación y deslizamiento
Subclase	Coccidia	El ciclo biológico incluye merogonia, gametogonia y esporogonia
Orden	Eucoccidiidae	La merogonia tiene lugar en hospedadores vertebrados
Suborden	Eimeriina	Existe desarrollo independiente de gametos masculinos (microgametos) y femeninos (macrogametos)
Familia	Sarcocystidae	Parásitos heteroxenos y formadores de quistes en el hospedador intermediario (diferentes especies de herbívoros). El hospedador definitivo (diferentes especies de carnívoros) elimina ooquistes en las heces.
Género	Neospora	
Especie	Caninum	

Adaptado de: (Granillo y Martínez, 2008, p. 24).

N. caninum por ser parte de la familia Sarcocystidae, se caracteriza por tener ciclos biológicos heteroxenos y formar quistes en el hospedador intermediario (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

N. caninum es un parásito heterógeno que afecta a varias especies mamíferas como bovinos, ovinos, caprinos, equinos, entre otros como hospederos intermediarios y al perro (Canis familiaris) como hospedador definitivo e intermediario cuando presenta neosporosis clínica, en los cuales el parásito se replica por reproducción asexual y sexual, produciendo taquizoítos y quistes tisulares; En el bovino ocurre una reproducción asexual (merogonia), asintomática, pero con capacidad de infección vertical o transplacentaria, para generar patología fetal y aborto (Lorenzo y Bernardini, 2007, pp. 172-175).

Las razas caninas afectadas con mayor frecuencia son: Labrador, Golden retriever, Bóxer, Pointer, Basset hound y Greyhound (Granillo y Martínez, 2008, pp. 1-32; Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45); mientras que el gato no parece serlo, ya que no emiten ooquistes al ingerir los bradizoítos (Greene, 2008, pp. 843-850). Se describe que los coyotes (Canis latrans) también actúan como hospederos definitivos (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Es importante destacar que hasta el momento no se han descrito casos zoonóticos de esta enfermedad. La infección en herbívoros es por el consumo de ooquistes del medio liberados por las heces de hospederos definitivos o también se describe una infección transplacentaria o vertical. Los ooquistes al momento de ser eliminados no son esporulados, estos llegan a esporular en el medio ambiente (Dubey, Hattel y Lindsay, 1988b, pp. 1259-1263).

Todos ellos tienen como hospedadores intermediarios a diferentes especies de herbívoros y como hospedadores definitivos a diferentes especies de carnívoros. Estos últimos eliminan ooquistes sin esporular en las heces, los cuales, tras esporular en el medio ambiente, presentan en su interior dos esporoquistes con cuatro esporozoítos cada uno (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Desde el punto de vista biológico, son notables las diferencias en cuanto a la composición antigénica, el ciclo biológico y las manifestaciones clínicas de la infección (Álvarez García, 2003, pp. 2-85). El empleo de pruebas diagnósticas serológicas específicas ha permitido diferenciar a N. caninum de otras especies gracias a su diferente composición antigénica. Por otra parte, el canino es el hospedador definitivo de N. caninum y H. heydorni, mientras que el gato es el hospedador definitivo de T. gondii y H. hammondi (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En cuanto a las manifestaciones clínicas, la parálisis del tercio posterior que presentan los animales congénitamente infectados por N. caninum, es un síntoma que no se ha observado en otras especies en las que se ha diagnosticado una infección por T. gondii y, hasta el momento, se desconoce la relevancia clínica de H. hammondi y H. heydorni (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

También se destacan las diferencias ultra estructurales, existentes entre estas especies, de los quistes tisulares y los taquizoítos. Los quistes tisulares de N. caninum presentan una pared quística más gruesa que los de T. gondii y H. heydorni. Así mismo, su presencia, localización y el número de determinadas organelas en el citoplasma de los taquizoítos difieren en los tres géneros mencionados (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Finalmente, una gran variedad de estudios sobre las secuencias genéticas y las relaciones filogenéticas existentes entre estos tres géneros han corroborado el hecho de que N. caninum, T. gondii y H. heydorni son especies diferentes (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.3 Morfología del parásito

Es importante mencionar que las cuatro especies estrechamente relacionadas: N. caninum, T. gondii, H. hammondi y H. heydorni, tienen ooquistes de un tamaño similar. Sin embargo, estas especies presentan importantes diferencias

tanto biológicas como estructurales, que justifican la existencia del género Neospora (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En el ciclo biológico de N. caninum se han identificado tres estadios diferentes: los taquizoítos, los quistes tisulares con bradizoítos en su interior y los ooquistes. Los dos primeros son muy similares en N. caninum y T. gondii cuando se observan mediante microscopio; sin embargo, existen notables diferencias ultra estructurales (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los que presentan una morfología y una estructura típicas de las fases infectantes de los Apicomplexa, poseen la siguiente estructura: dos anillos polares, un conoide, una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, 22 microtúbulos subpeliculares, micronemas, roptrias, una mitocondria, un núcleo, el aparato de Golgi, ribosomas, polisomas, gránulos densos, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplasmático liso y rugoso; y un poro posterior (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

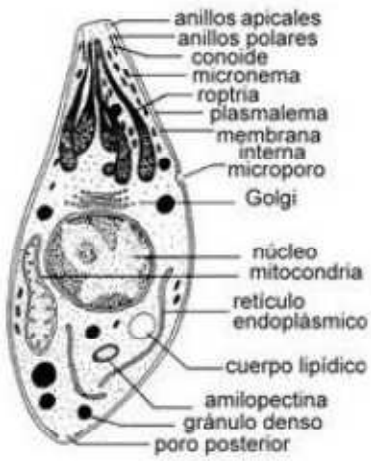


Figura No1. Morfología de un Taquizoíto de N. caninum.
Tomado de: (Venturini, 2007).

Los taquizoítos de N. caninum son de morfología ovoide y su tamaño oscila entre 3-7 µm de longitud y 1-5 µm de anchura, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren. En su citoplasma se encuentran hasta 150

micronemas y de 8 a 18 roptrias. El número de micronemas es muy variable y pueden encontrarse orientados de forma perpendicular a la membrana interna. Las roptrias contienen material muy electrodenso y son de 2 a 4 veces más gruesas que los micronemas (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los quistes tisulares tienen forma redondeada u oval y pueden medir hasta 107 µm de longitud. Su pared puede llegar a medir más de 4 µm de grosor, y está compuesta por una pared quística primaria y una capa granular gruesa. La pared primaria consiste en una única membrana, la cual tiene su origen en la membrana de la vacuola parasitófora, mientras que la capa granular contiene vesículas electrodensas incluidas dentro de una matriz electrodensa (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En las fases iniciales de la formación del quiste, éste presenta un tamaño de aproximadamente 17 µm y una pared delgada y regular, mientras que los quistes maduros son más grandes y su pared es más gruesa con un mayor número de invaginaciones de la pared primaria (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

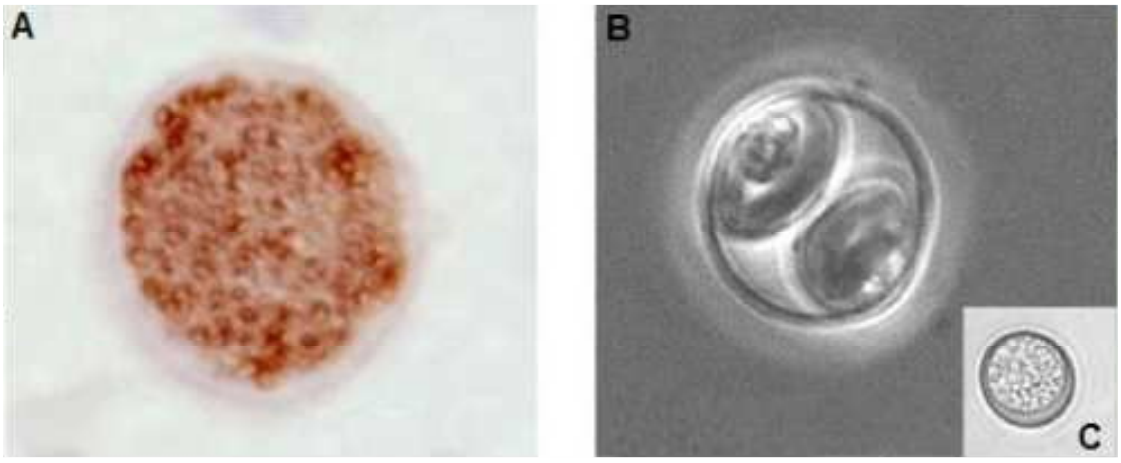


Figura No 2. Quiste Tisular y Ooquiste de N. caninum.
Nota: (A) Quiste Tisular albergando bradizoítos; (B) Ooquiste esporulado conteniendo 2 esporoquistes con 4 esporozoítos y (C) Ooquiste sin esporular
Adaptado de: (Risco Castillo, 2008, p. 4).

En su interior se pueden encontrar hasta 200 bradizoítos, los cuales son delgados, miden 6-8 µm de longitud por 1-1.8 µm de anchura y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor. Por otro lado, cabe destacar la ausencia de características estructurales diferenciales entre los quistes tisulares y los bradizoítos de origen canino y bovino (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

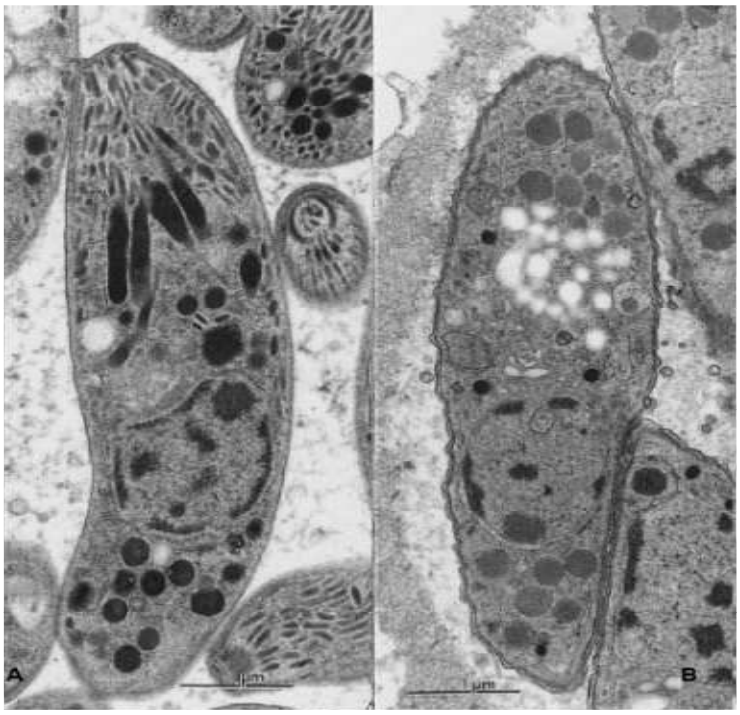


Figura No 3. (A) Taquizoíto y (B) bradizoíto de N. caninum.
Tomado de: (Vonlaufen, 2003, p. 9).

Recientemente se han aislado ooquistes de N. caninum procedentes de infecciones experimentales en el canino. Morfológicamente, se han observado pocas diferencias respecto a los de T. gondii y H. heydorni; los ooquistes no esporulados tienen forma esférica y su tamaño es de 11.7 µm de longitud y 11.3 µm de anchura. En su interior, no se aprecia el cuerpo residual ooquístico (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En cuanto al ooquiste esporulado, la pared es lisa, presenta un grosor de 0.6-0.8 µm y no contiene el micropilo. En su interior se encuentran dos

esporoquistes elipsoidales (8.4 µm de longitud por 6.1 µm de anchura), cuya pared de 0.6-0.8 µm de grosor no contiene el cuerpo de Stieda. A su vez, en el interior de cada esporoquiste se encuentran cuatro esporozoítos (6.5 µm de longitud por 2.0 µm de anchura) y el cuerpo residual esporoquístico (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Las fases sexual y asexual del parásito pueden completarse en el canino, en cuanto a las fases enteroepiteliales del parásito no se han identificado hasta el momento (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.4 Biología del parásito

2.4.1 Rango de hospedadores

La infección natural por N. caninum se ha descrito, además del perro y el ganado bovino, en la cabra, la oveja, el caballo, el búfalo de agua y en el camello. En animales silvestres, la infección ha sido detectada en el ciervo, el antílope, el mapache, el coyote, el zorro, el dingo, felinos salvajes y el rinoceronte (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

La infección experimental ha sido establecida en el ratón, la rata, el jerbo, el gato, el perro, el coyote, el zorro, la vaca, la oveja, la cabra, el cerdo, el macaco y en diversas especies de pájaros. El papel de cada una de estas especies hospedadoras en el ciclo biológico del parásito y su importancia en relación con la transmisión de la infección no están totalmente identificados (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.4.2 Ciclo biológico

Hasta el año 1998, solo se conocían algunas especies hospedadoras implicadas en el ciclo biológico de N. caninum y la única vía de transmisión demostrada era la transplacentaria. Los estudios experimentales de McAllister y otros (1998, pp. 1473-1478), fueron definitivos en el conocimiento de la

biología de este parásito, ya que demostraron el papel del canino como hospedador definitivo de N. caninum, y la forma de transmisión horizontal. Se conocen tres estadios del ciclo biológico de N. caninum, el taquizoíto, el quiste tisular con bradizoítos en su interior y el ooquiste (esporulado y no esporulado) (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los taquizoítos, son los responsables de la fase aguda de la infección, pueden invadir una gran variedad de tipos celulares en el hospedador parasitado: macrófagos, neutrófilos, células neuronales, hepatocitos, fibroblastos, miocitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos y renales. En los caninos infectados que presentan cuadros de paresia los taquizoítos se encuentran con mayor frecuencia en la musculatura estriada, aislándose fácilmente del músculo cuádriceps (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

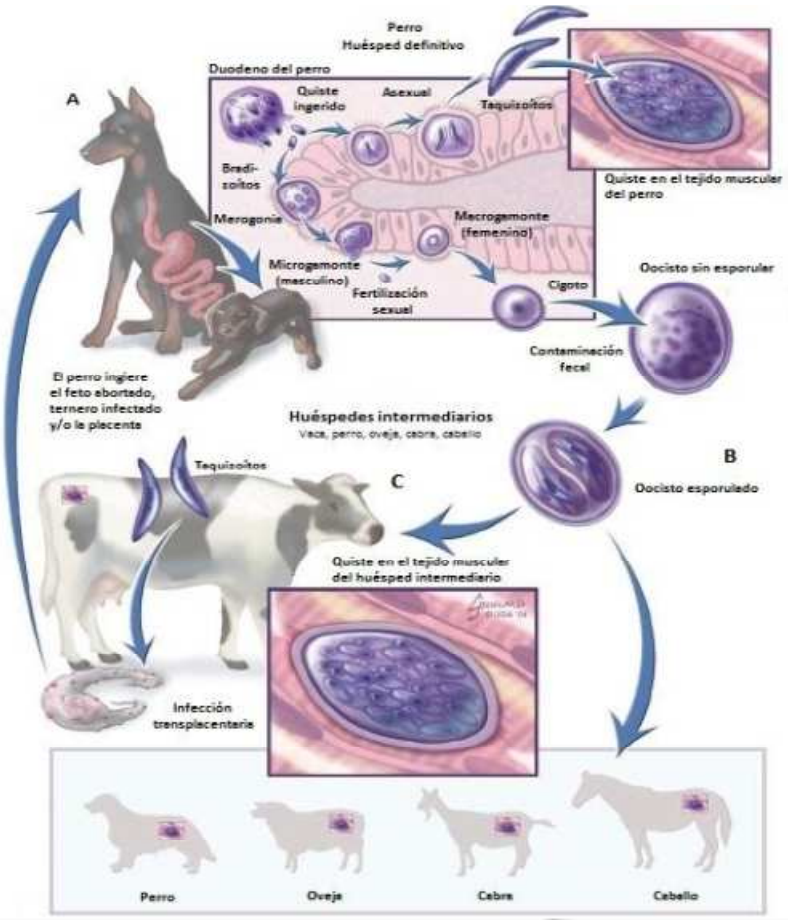


Figura No 4. Ciclo Biológico de Neospora caninum.
Tomado de: (Greene, 2008, p. 844).

N. caninum es un parásito intracelular obligado, por lo tanto el reconocimiento de la célula hospedadora es un requisito necesario para que tenga lugar la invasión y multiplicación. Los taquizoítos penetran en la célula hospedadora mediante invasión activa en menos de 5 minutos, localizándose en el interior de una vacuola parasitófora en el citoplasma (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

El fenómeno de invasión celular ha sido ampliamente estudiado en cultivos celulares el cual consiste de un previo reconocimiento y adhesión a la célula hospedadora. En el interior de la vacuola parasitófora los taquizoítos se multiplican mediante endodiogenia, pudiendo albergar en una sola célula más de 100 taquizoítos. Tras la ruptura celular, los taquizoítos salen al medio extracelular y en pocas horas se iniciarán los mecanismos de adhesión e invasión de nuevas células diana (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

La destrucción celular y la enfermedad dependen de un equilibrio entre la habilidad de los taquizoítos para penetrar y multiplicarse en la célula hospedadora y la habilidad del hospedador para inhibir la multiplicación del parásito (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los quistes tisulares con bradizoítos en su interior, son los responsables de la fase crónica de la infección, han sido observados tanto en el tejido nervioso (cerebro, médula espinal, nervios periféricos y retina) de diversas especies con infecciones naturales y experimentales, como en el tejido muscular esquelético del perro y de la vaca con infecciones naturales. Los mecanismos implicados en la conversión del taquizoíto en bradizoíto, y por el paso de una fase de infección aguda a una crónica, no han sido esclarecidos si bien están siendo objeto de estudio en la actualidad (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

La transmisión horizontal, sin demostrar durante más de una década, se confirmó con la eliminación fecal de ooquistes sin esporular en caninos de 8 semanas de edad, tras la administración de tejidos infectados por N. caninum procedentes de ratones infectados experimentalmente (Álvarez García, 2003, pp. 2-85). Posteriormente, Lindsay, Ritter y Brake (2001a, pp. 909-911)

corroboraron este hecho al detectar eliminación de ooquistes en caninos que habían sido alimentados con tejido que contenía quistes tisulares procedente de ratones infectados con taquizoítos (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Así mismo, comprobaron que los ooquistes eliminados esporulaban en el medio ambiente transcurridas 48-72 horas. Sin embargo, se desconoce si los caninos pueden eliminar ooquistes tras la ingestión de ooquistes esporulados y no se han evidenciado las fases enteroepiteliales del parásito. Por otro lado, el bajo número de ooquistes eliminados en las heces de los caninos puede ser un indicio de que, posiblemente, el canino no sea el mejor hospedador definitivo en la naturaleza (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Se especula la hipótesis de que otras especies puedan actuar como hospedadores definitivos. Las investigaciones que se han llevado a cabo en diversas especies de mustélidos y no han aportado información concluyente al respecto (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En cuanto a los estudios realizados en el zorro rojo (Vulpes vulpes) han demostrado que interviene como hospedador intermediario en el ciclo biológico de N. caninum al haberse diagnosticado la infección mediante la técnica de PCR y pruebas serológicas y no haberse detectado la eliminación de ooquistes en zorros con infección natural, ni con infección experimental (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.4.2.1. Ciclo sexual

El ciclo sexual tiene lugar en el hospedador definitivo, demostrándose experimentalmente la eliminación de ooquistes no esporulados en el canino (López Pérez, 2010, pp. 13-16), en donde la eliminación dura un período de tiempo de 1 a 2 semanas a más, pudiendo re-excretar ooquistes luego de un período refractario de 8 a 18 meses si vuelven a ingerir tejidos infectados de hospedadores intermediarios (Bañales, Delucchi, Easton y Piaggio, 2012), como el ganado vacuno, búfalos de agua y ciervos de cola blanca, con

infección natural, así como ratones infectados experimentalmente (López Pérez, 2010, pp. 13-16).

Sin embargo, se conoce poco acerca de las posibles fuentes de infección y la eliminación de ooquistes en caninos con infección natural sólo se ha descrito en pocos casos (López Pérez, 2010, pp. 13-16). La reproducción sexual del parásito, se produce en las células epiteliales del intestino (duodeno) del hospedador definitivo (Greene, 2008, pp. 843-850), donde tendrían lugar las fases de producción de gametos (gametogonia) y la unión de gametos para la formación del cigoto (singamia), así como la producción de ooquistes (López Pérez, 2010, pp. 13-16).

En el ambiente, en condiciones óptimas los ooquistes esporularían a las 24 a 72 horas de su eliminación (López Pérez, 2010, pp. 13-16; Greene, 2008, pp. 843-850), resultando infecciosos a los tres días de haber sido eliminados (López Pérez, 2010, pp. 13-16). Aunque nada se sabe acerca de la supervivencia de los ooquistes de N. caninum en el ambiente, se ha sugerido que éstos pueden ser la fuente de infección para otros caninos y para los bovinos (López Pérez, 2010, pp. 13-16).

2.4.2.2 Ciclo asexual

Los taquizoítos y los bradizoítos son los estadios invasivos que se multiplican asexualmente en el hospedador intermediario, los ooquistes esporulados se forman en pocos días en el intestino (duodeno) (López Pérez, 2010, pp. 13-16) y al momento de eliminarse a través de las heces durante varias semanas, estas llegan a esporular en el ambiente durante 24 a 72 horas (Bañales et al., 2012), después de la ingestión de los ooquistes esporulados, se produciría la liberación de los esporozoítos en el intestino delgado de manera rápida parasitando inmediatamente el epitelio intestinal, transformándose en taquizoítos y multiplicándose, posiblemente, en los ganglios linfáticos mesentéricos (López Pérez, 2010, pp. 13-16), y rápidamente invadiendo todo el organismo (Bañales et al., 2012).

Desde aquí, los taquizoítos podrían alcanzar el torrente sanguíneo produciéndose la diseminación orgánica del parásito. Durante la fase aguda de la infección, los taquizoítos se multiplican intracelularmente por endodiogenia en diversos tipos celulares (López Pérez, 2010, pp. 13-16).

En la fase crónica, la respuesta inmunitaria del hospedador favorece que los taquizoítos se diferencien en bradizoítos dando lugar a los quistes tisulares, que se localizan principalmente en el tejido nervioso, aunque también pueden encontrarse en el tejido muscular esquelético (López Pérez, 2010, pp. 13-16).

Los bradizoítos en el interior del quiste tisular conservan su capacidad infectante durante períodos de tiempo prolongados. Durante la gestación, se puede producir la reactivación de los bradizoítos que se diferenciarían en taquizoítos, cruzarían la placenta e infectarían al feto en desarrollo (López Pérez, 2010, pp. 13-16).

2.4.3 Resistencia a factores bióticos y abióticos

Los taquizoítos dejan de ser infectivos a las pocas horas de haberlos inoculado en el cultivo celular, si en ese tiempo llega a penetrar en una célula hospedadora. La presencia de agentes como el interferón-γ (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral-α (TNF-α) en el medio extracelular pueden afectar a la adhesión e invasión celular ya que inhiben la multiplicación intracelular del parásito (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En los quistes, los bradizoítos conservan su capacidad infectante durante períodos de tiempo prolongados (al menos 1 año en cerebro de ratones con infección experimental) y son resistentes a la acción del Ácido clorhídrico (HCl) y la pepsina, lo que confirma la hipótesis demostrada de que el hospedador definitivo es un carnívoro (perro). Los quistes tisulares pueden sobrevivir hasta 14 días a 4ºC. Sin embargo, los bradizoítos conservados en tejido nervioso a -20 ºC mueren transcurridas 24 horas (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Posteriormente, McGuire, McAllister y Jolley (1997a, pp. 319-321) estudiaron la viabilidad de los quistes tisulares separados del tejido nervioso, comprobando que los quistes eran resistentes a una solución de HCl-pepsina y los bradizoítos mantenían su infectividad tras ser sometidos a un tratamiento de criopreservación en nitrógeno líquido durante 36 días (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.5 Epidemiología

2.5.1 Hospedero

N. caninum causa infección natural en caninos, bovinos, de igual manera, en equinos, felinos, pequeños rumiantes y animales silvestres, siendo posible la infección experimental en ratones, ratas y jerbos. Se ha descrito la presencia de anticuerpos anti-Neospora caninum en el humano aunque sin enfermedad clínica (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Se cree que cualquier raza canina puede ser afectada con la infección, se ha confirmado la enfermedad en más de 30 razas: Yorkshire terrier, Cavalier spaniel, West highland white terrier, Border collie, Springer spaniel, Husky siberiano, Gran danés, Boyero de Berna, Labrador retriever, Golden retriever, Greyhound, Basset hound, Bóxer y Lebrel irlandés. No se conoce el efecto de la raza en la eliminación de los ooquistes (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

En estudios recientes, N. caninum ha mostrado ser más patógeno para el ratón que para otras especies animales. Aparentemente los caninos eliminan más ooquistes después de ingerir tejidos bovinos que después de alimentarse con tejidos de ratas o ratones infectados, siendo los caninos jóvenes los que eliminan más ooquistes en comparación con los adultos (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

La neosporosis clínica es reportada con mayor frecuencia en camadas de 3 a 6 semanas, sin embargo los casos confirmados han ocurrido en caninos tan

jóvenes como de 2 días de edad y tan viejos como de 15 años. La neosporosis puede presentarse en caninos de ambos sexos, procedentes de áreas urbanas o rurales, otras enfermedades concurrentes como el virus del distemper canino no son comunes en la neosporosis, aunque la inmunosupresión (natural o iatrogénica) puede exacerbar la enfermedad (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.5.2 Agente Etiológico

2.5.2.1 Aislamientos

El primer aislamiento de N. caninum -NC-1- se consiguió en EE.UU en el año 1988, a partir de tejido nervioso de caninos infectados. Desde ese momento, otros aislados, tanto de N. caninum de origen canino y bovino como de N. hughesi de origen equino, se han obtenido en diferentes países (tabla 2 y 3) (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los primeros aislados de N. caninum fueron obtenidos directamente en cultivo celular, con el pasar del tiempo se han incluido ligeras modificaciones en la técnica de aislamiento incluyendo el aislamiento previo en ratones atímicos y en jerbos (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Tabla No 2. Información del aislamiento de cepas de N. caninum.

Denominación	País	Origen	Muestra	Aislamiento
NC-1	EE.UU.	Canino	SNC	Cultivo celular
NC-2	EE.UU.	Canino	SNC	Cultivo celular
NC-3	EE.UU.	Canino	SNC	Cultivo celular
BPA-3 y 4	EE.UU.	Bovino (ternero)	SNC	Cultivo celular
NC-Liv	GBR	Canino	Cerebro	Cultivo celular
BPA-1 y 2	EE.UU.	Bovino (feto)	Cerebro	Cultivo celular
JPA-1	JAP	Bovino (ternero)	Cerebro	Cultivo celular

NC-SweB1	SUE	Bovino (ternero)	Cerebro	Cultivo celular
NC-4 y 5	EE.UU.	Canino	SNC	Cultivo celular
JPA-2, 4 y 5	JAP	Bovino (ternero)	SNC	Ratón y cultivo celular
BT2	JAP	Bovino (ternero)	SNC	Ratón y cultivo celular
NC-LivB1	GBR	Bovino (ternero)	Cerebro	Cultivo celular
NC-PV1	ITA	Bovino (ternero)	Cerebro	Cultivo celular
KBA-1 y 2	Corea	Bovino (ternero) y (feto)	Cerebro	Cultivo celular
NC-GER1	GER	Canino	SNC	Cultivo celular
BT-3	JAP	Bovino (vaca)	Cerebro	Ratón y cultivo celular
NC6-Argentina	ARG	Canino	Heces	Cultivo celular
NC-Bahia	BRA	Canino	Cerebro	Gerbo y cultivo celular
NC-Porto1	POR	Bovino (feto)	Cerebro	Ratón
NC-Nowra	AUS	Bovino (ternero)	Cerebro	Ratón y cultivo celular

Adaptado de: (Álvarez García, 2003, p. 10).

Tabla No 3. Aislamiento de cepas de N. hughesi.

Denominación	País	Origen	Muestra	Aislamiento
CN1	EE.UU.	Equino	SNC	Cultivo celular
Aislado Oregón	EE.UU.	Equino	Médula espinal	Cultivo celular

Adaptado de: (Álvarez García, 2003, p. 11).

En la actualidad, la información sobre la diversidad genética y biológica del parásito y las variaciones en la patogenicidad de los diferentes aislados es escasa. Esta diversidad podría estar relacionada con las diferentes manifestaciones clínicas que se han encontrado en el ganado bovino (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En el estudio realizado por Barber y otros (1995, pp. 563-568) no se encontraron diferencias entre el aislado europeo (NC-Liv) de origen bovino y el americano (NC-1) de origen canino, en cuanto al crecimiento en cultivos celulares y a las características antigénicas y genéticas (Álvarez García, 2003, pp. 2-85). Mientras que Lindsay, Lenz, Cole, Dubey y Blagburn (1995a, pp. 313-315) sí detectaron diferencias en cuanto a la patogenicidad entre dos aislados de origen canino -NC-1 y NC-3-, al igual que Atkinson, Harper, Ryce, Morrison y Ellis (1999, pp. 363-370) entre el aislado NC-Liv y NC-SweB1 de origen bovino (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

El estudio realizado por Schock, Innes Yamane, Latham y Wastling (2001, pp. 13-23) puso de manifiesto las variaciones biológicas y genéticas existentes entre los aislados NC-1 y NC-Liv, en donde se compararon 6 aislados diferentes de N. caninum de origen canino y bovino -NC-1, NC-Liv, BPA1, NC-SweB1, JPA-2 y NC-LivB1- mediante un análisis de polimorfismo de amplificaciones aleatorias (RAPD), western blot y multiplicación en cultivo celular (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los resultados obtenidos indican la rapidez de crecimiento del aislado NC-Liv en comparación al resto de aislados, incluyendo el aislado NC-1, en donde el análisis RAPD reveló una variación genética significativa entre todos los aislados. Estos resultados in vitro reflejan los resultados obtenidos in vivo por Atkinson y otros (1999, pp. 363-370), donde de igual manera se encontraron diferencias biológicas y genéticas entre los aislados NC-SweB1 y NC-Liv, observándose una mayor patogenicidad del aislado NC-Liv en el modelo murino y diferencias genéticas mediante un análisis por la técnica de RAPD-PCR (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.5.2.2 Cultivo in vitro

Estas técnicas de cultivo in vitro se caracterizan porque ocurren a micro escala, sobre todo en una superficie pequeña, se optimizan las condiciones ambientales, en lo que se refiere a factores físicos, nutricionales y hormonales, se excluyen todos los microorganismos como hongos, bacterias y virus, de igual manera las plagas de las plantas superiores: insectos y nemátodos (Pierick, 1987, pp. 29-36).

Al inicio los taquizoítos de N. caninum se cultivaron en monocitos bovinos y células endoteliales de arteria cardio-pulmonar bovina, se han cultivado en diferentes líneas celulares como: líneas Vero y Marc-145; células de riñón bovino y fibroblastos de piel humana (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los taquizoítos pueden mantenerse indefinidamente en cultivo celular sin pérdida aparente de su infectividad para el ratón, las cuales se conservan en nitrógeno líquido. El efecto citopático en los cultivos celulares en monocapa se observa a los 3 días p.i., apreciándose la destrucción total de las células infectadas y de la monocapa a los 4-6 días p.i. (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En los cultivos celulares, cuando ha transcurrido 45-60 minutos pos-infección (p.i.), finaliza la invasión celular y comienza la endodiogenia apareciendo la primera generación de zoítos a las 8-10 horas p.i. A las 36 horas p.i. se observan células infectadas con más de 10 taquizoítos incluidos en el interior de una vacuola parasitófora bien desarrollada. Seguidamente, el número de taquizoítos se multiplica pudiendo observarse más de 100 en una misma célula a los 4 días (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

La adhesión de los taquizoítos a las células Vero aumenta con un período de incubación corto (10 min.) a 37°C y se ha relacionado con la secreción de proteínas de micronemas como la NcMIC3. Si los taquizoítos en el cultivo

celular no penetran en la célula hospedadora, dejan de ser infectivos a las pocas horas p.i. (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

El cultivo in vitro de los taquizoítos han permitido, estudiar las características ultra estructurales del parásito, los mecanismos de adhesión e invasión celular y su utilización como antígeno en el desarrollo de pruebas diagnósticas (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.5.2.3 Proteínas de N. caninum

El mantenimiento in vitro ha permitido purificar un elevado número de taquizoítos para la obtención y análisis de sus proteínas. En la actualidad, numerosas investigaciones se están centrando en la identificación y caracterización de proteínas y glicoproteínas del parásito con interés inmunodiagnóstico e inmunoprofiláctico (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Howe y Sibley (1999, pp. 1489-1496) establecieron una nomenclatura común para denominar a las proteínas de N. caninum, esto facilita a las comparaciones entre las diferentes especies de la subfamilia:
Las proteínas localizadas en micronemas se denominan: MIC o MAP (proteínas asociadas a micronemas); los gránulos densos: GRA; las roptrias se denominan: ROP y los antígenos de superficie: SAG o SRS (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

A medida que se han ido descubriendo nuevas proteínas se han añadido números a las siglas: las proteínas de micronemas de T. gondii se denominan TgMIC1, TgMIC2. En el caso de N. caninum, las proteínas homólogas se denominan empleando el prefijo “Nc” (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

● Antígenos específicos de estadio

Al momento de comparar la composición antigénica entre el taquizoíto (fase responsable de la infección aguda) y el bradizoíto (fase responsable de la

infección crónica), la información disponible hasta el momento es escasa, ya que tan solo se ha realizado un estudio en el que se identificaron antígenos específicos del taquizoíto y/o bradizoíto (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En el estudio realizado por Fuchs, Sonda, Gottstein y Hemphil (1998, pp. 753-758) se analizaron tres antígenos específicos, uno de gránulos densos (NcGRA7) y dos se superficie (NcSAG1 y NcSRS2). Los resultados demuestran la existencia de antígenos compartidos entre los taquizoítos y los bradizoítos, de igual manera se identificaron antígenos específicos de cada uno de los estadios. El antígeno NcSAG1 se presenta únicamente en taquizoítos, y los antígenos NcGRA7 y NcSRS2 se presentan en los taquizoítos y los bradizoítos (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Recientemente en un estudio realizado por Sonda, Fuchs, Gottstein y Hemphil (2000, pp. 39-51) y, Keller y otros (2002, pp. 3187-3198) han identificado dos proteínas de micronemas (NcMIC3 y NcMIC1) que se expresan en ambos estadios del parásito. En relación a los antígenos específicos del bradizoíto de Neospora no se ha identificado ninguno hasta el momento, debido a la dificultad de obtener quistes con bradizoítos tanto en cultivos in vitro como in vivo (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

● Localización y función de las proteínas de N. caninum

La identificación, caracterización y localización de los antígenos del parásito pueden ayudar a entender el rol de éstos en los mecanismos de adhesión, invasión y multiplicación de N. caninum. A diferencia de otros patógenos intracelulares, los cuales penetran en la célula hospedadora mediante fenómenos de fagocitosis o endocitosis, los parásitos Apicomplexa efectúan la invasión de la célula mediante un proceso activo en el cual intervienen procesos de motilidad, adhesión a moléculas de superficie y penetración en la célula hospedadora (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Para poder realizar estos procesos complejos de adhesión e invasión celular, los Apicomplexa cuentan con un gran número de proteínas específicas. La característica más importante de los zoítos (fases invasivas) de este grupo es el complejo apical localizado en el extremo anterior del parásito (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En la mayoría de los parásitos del phylum Apicomplexa el complejo apical interviene en el reconocimiento y penetración de las células hospedadoras. Antes, durante y después de la invasión celular, moléculas específicas son secretadas por organelas secretoras específicas (gránulos densos, roptrias y micronemas), la mayoría de estas se localizan en el extremo anterior del parásito formando parte del complejo apical (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Considerando que N. caninum y T. gondii son parásitos estrechamente relacionados, las moléculas de superficie y las asociadas a las organelas secretoras descritas, hasta el momento, han demostrado un alto grado de homología entre ambos parásitos (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

● Características Antigénicas del parásito

1. Superficie

Las proteínas que forman parte de la superficie, son necesarias para la supervivencia del parásito, estas están involucradas en los procesos previos de adhesión e invasión celular, siendo las responsables de iniciar las interacciones entre el patógeno y las moléculas de la superficie de la célula y estimular la respuesta inmune desarrollada por el hospedador (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2. Gránulos Densos

Los gránulos densos son organelas secretoras, que se localizan en el extremo anterior y posterior del parásito. Las moléculas que secretan los gránulos

densos se dirigen hacia la superficie del parásito, facilitando la interacción del zoíto con la célula hospedadora y su posterior invasión, o son secretadas dentro de la vacuola parasitófora durante y después de la penetración en la célula hospedadora formando parte del entramado y de la membrana de la vacuola parasitófora (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

La secreción de estas proteínas tiene lugar durante el periodo de multiplicación intracelular del parásito. No se ha determinado el papel que juegan estas moléculas en el mantenimiento y multiplicación del parásito dentro de la célula hospedadora, se han realizado diversos estudios sobre la función y la composición molecular de los gránulos densos en géneros como Sarcocystis, Plasmodium, Babesia y Toxoplasma (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

3. Roptrias

Las roptrias son organelas que están relacionadas con la invasión de la célula hospedadora y el establecimiento temprano de la infección y algunas de ellas forman parte de la vacuola parasitófora (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

4. Micronemas

La función de estas es la invasión y adhesión celular; para llevar a cabo estas funciones, el contenido de los micronemas es secretado por la zona apical de los zoítos, posiblemente esto suceda en el momento del contacto inicial con la célula hospedadora, distribuyéndose sobre la superficie del parásito (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Una vez en la superficie del parásito, las proteínas de los micronemas intervienen en la interacción con las moléculas de la célula hospedadora estableciendo una fuerte unión entre el parásito y la célula, para iniciar el proceso de invasión activa (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.5.3 Ambientes

Climas templados y húmedos favorecen la esporulación y supervivencia de los ooquistes, lo cual puede incrementar el riesgo de infección post natal, en cuanto a los rangos de temperatura y humedad óptimos aún no han sido definidos. Diversos factores como la altitud y climas fríos y poco húmedos dificultan la supervivencia del ooquiste infectivo (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.5.4 Distribución Geográfica

Actualmente, la neosporosis se considera como la principal causa de aborto en el ganado bovino en: norte, centro y sur de América, Australia, África, Europa y probablemente en Asia (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

La infección por N. caninum en el ganado vacuno tiene una amplia distribución a nivel mundial, los estudios epidemiológicos realizados muestran tasas de prevalencia elevadas, tanto individuales como de rebaño y tanto en sistemas de producción lechera como de carne (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

Esta enfermedad fue descrita hace dos décadas atrás, en donde, los avances en el conocimiento han ido creciendo con el pasar del tiempo y han llegado a ser satisfactorios, quedando por investigar numerosos aspectos relacionados con la prevención y control de la enfermedad (Gamón, 2010, pp. 2-19).

En Estados Unidos, California, existe una tasa de más del 87% de vacas seropositivas en algunos rebaños. En Holanda 78% animales son seropositivos de todos los rebaños que han sido estudiados (Pabón Valverde, 2007, pp. 11-32).

En el Reino Unido, de 6000 abortos bovinos ocurridos anualmente el 12.5% son seropositivos. En España, un estudio reciente realizado por un grupo de investigación, en Galicia, Asturias y Castilla León, resulto ser seropositivo el 38.8% de todos los fetos analizados. La frecuencia de infección fetal también

es elevada en otros países europeos como Suiza (21%) y Francia (17-45%) (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

En cuanto a los caninos, existen reportes de eliminación de ooquistes a partir de animales naturalmente infectados en Argentina, República Checa, Gran Bretaña, Brasil, Alemania y Portugal. Se debe tomar en cuenta, la investigación sobre la frecuencia natural de la transmisión postnatal en el canino o existencia de otras especies de hábitos carnívoros que pudiesen comportarse como hospedadores definitivos de la enfermedad (Gamón, 2010, pp. 2-19).

Según reportes de diferentes autores y de acuerdo a estudios ya realizados, en lo que se refiere al Ecuador; se sabe que N. caninum está presente en las principales zonas lecheras de la sierra así como en las otras regiones (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51); la enfermedad también ha sido reportado en la zona centro norte de la sierra por Lozada (2004, pp. 1-85) de 395 muestras, resultó que el 42% de animales eran seropositivos. Se reporta la evaluación del efecto de la vacuna Bovilis®Neoguard en la reducción de la tasa de abortos en la sierra, estudio realizado por Sáenz Aguirre (2008, pp. 9-23) de 913 animales sin vacuna y 2518 con vacuna, se obtuvo un 44.78% de protección.

No existe reportes de tesis realizadas en caninos en el Ecuador, en Lima, Perú, en un estudio realizado por Cornejo Prado (2004, pp. 1-18), se evaluó 124 sueros caninos, provenientes de 24 establos lecheros, se halló una prevalencia del 19.35±6.95 % (24/124). En Chile, por Flores Yánez (2006, pp. 6-16), se obtuvo muestras 110 caninos, se detectó un 35,5% de seropositivos.

En México, en un estudio realizado por Gamón (2010, pp. 2-19), del total de 57 perros, 27 provenían de 9 establos y 30 provenían del Distrito Federal, se encontró 14 seropositivos vivían en los establos 51.85%, y 6 seropositivos que vivían en la ciudad 20%. En Brasil, en un estudio realizado por Moreno Boaventura (2008, pp. 15-22), se tomaron muestras 197 animales, distribuidos de la siguiente manera: 72 del Centro de Zoonosis y 125 de hospitales veterinarios, los 72 animales del centro de zoonosis el 36,1% (26/72) mostró

resultados positivos, y los 125 caninos del hospital veterinario UFG y clínicas privadas, el 31,2% (39/125).

Existen diferencias en las prevalencias no sólo según el país que se esté estudiando sino también la región donde esté ubicado los rebaños analizados, lo cual hace que cada país o región sean diferentes los factores de riesgo y el impacto económico (Pabón Valverde, 2007, pp. 11-32).

2.5.5 Transmisión

Como ya se ha mencionado anteriormente, N. caninum es un protozoo Apicomplexa, estrechamente relacionado con T. gondii y que presenta grandes similitudes en su ciclo biológico y sus modos de transmisión. N. caninum tiene un amplio espectro de hospedadores (Pérez Zaballos, 2004, pp. 1-24).

Las vías naturales de infección no están completamente esclarecidas aunque experimentalmente N. caninum tiene capacidad infectante si es inoculado por vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal u oral (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.5.5.1 Transmisión Vertical

La neosporosis canina congénita, ha sido reproducida experimentalmente vía inoculación subcutánea e intramuscular de taquizoítos de cultivos celulares (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Jacobson y Jardine (1993, pp. 47-51) demostraron que las hembras caninas con infección subclínica pueden transmitir la neosporosis a sus camadas, comprometiendo hasta el 70% de sus cachorros. Sin embargo, estudios más recientes concluyeron que la tasa de transmisión vertical en canino es baja, ya que el 80% de los cachorros de hembras seropositivas no están infectados al nacimiento (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

En cuanto a la ingestión de leche o calostro de origen bovino infectados con taquizoítos de N. caninum no es una posible vía de infección para los caninos (Álvarez García, 2003, pp. 2-85), en cuanto al calostro de las madres caninas pueden pasar a los cachorros, sin embargo estos niveles desaparecen sin producir infección a los 32 días de vida (Greene, 2008, pp. 843-850).

Ciertos cachorros que llevan la infección de manera subclínica, la enfermedad puede llegar a reactivarse cuando aparecen: ciertas enfermedades inmunosupresoras, al administrar vacunas VVM (virus vivo modificado) o administración de glucocorticoides (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.5.5.2 Transmisión Horizontal

Se ha demostrado la transmisión horizontal de N. caninum entre animales salvajes y domésticos, los caninos pueden actuar como hospedadores intermediarios al consumir alimento o agua de bebida contaminados con quistes esporulados de N. caninum, la infección post natal y de animales adultos se puede presentar por la ingestión de tejidos de bovinos contaminados con taquizoítos como: fetos abortados, placentas, restos de animales muertos, calostro y leche (no hay eliminación de ooquistes luego de la ingestión) (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Hasta el momento no existen evidencias de transmisión horizontal entre los bovinos, aunque se ha sugerido que la ingestión de placentas infectadas podría ser una posible forma de infección, pero se demostró que las vacas seronegativas alojadas con vacas seropositivas permanecen negativas, al igual que su progenie, mientras que las vacas seropositivas tuvieron terneros congénitamente infectados. (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

La infección por transmisión horizontal entre los caninos y bovinos, tiene lugar por la ruta orofecal, en donde, el hospedador definitivo elimina pequeñas cantidades de ooquistes, lo cual contaminan: pastos, forrajes, agua de bebida y piensos almacenados los cuales son consumidos por los bovinos. La

eliminación de ooquistes luego de la ingestión de placentas infectadas es mayor que luego de la ingestión de fetos abortados o de calostro contaminado (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.6 Patogenia

N. caninum es altamente patógeno para caninos y bovinos, puede presentarse en ovejas, cabras, caballos y ciervos. Esta enfermedad comúnmente causa muerte celular, la cual se da por la multiplicación activa de los taquizoítos y es capaz de producir lesiones necróticas sumamente visibles en pocos días (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

En comparación con la toxoplasmosis, la cual es asociada con enfermedades inmunosupresoras primarias como el virus del Distemper, parece que N. caninum es un patógeno primario, ya que ningún otro agente etiológico ha sido identificado en la neosporosis canina grave. En los caninos se presenta como enfermedad neuromuscular severa, ya que, destruye una variedad de células neuronales incluyendo células de los nervios craneales y espinales, la presencia de un gran número de organismos infecciosos pueden llegar alterar la conductividad de las células afectadas (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Los quistes tisulares normalmente no originan reacción inmunológica del hospedero, en los caninos no se sabe exactamente cuánto tiempo pueden permanecer en el sistema nervioso central, ya que en los ratones infectados experimentalmente, permanecen viables al menos por 1 año. La carga parasitaria y la cepa involucrada influirán en la severidad de las infecciones resultantes (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

La variación en el número y la distribución del parásito en el hospedero se debe a las rutas de infección y a la diferencia de la respuesta inmunológica según la etapa de la enfermedad. Se cree que la diseminación de los taquizoítos en los órganos viscerales ocurre en la fase aguda de la infección y más tarde, los

organismos se restringen a los sistemas nervioso y muscular (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.6.1 Signos Clínicos

2.6.1.1 Caninos

Los cachorros congénitamente infectados a menudo no manifiestan ningún signo clínico de enfermedad, sin embargo cuando los presentan, suelen ser casos severos en donde los cachorros cursan signos neurológicos como ataxia, reflejo patelar disminuido o pérdida de orientación (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45). En los cachorros más jóvenes, los signos con frecuencia se detectan desde las 3 o 9 semanas de edad, los cachorros con infección diseminada pueden presentar estadios parasitarios en el timo, hígado, riñón, estómago, glándulas adrenales y piel, entre otros tejidos. Se puede observar lesiones que contienen parásitos en los músculos, corazón cerebro, médula espinal, raíces nerviosas y retina (Greene, 2008, pp. 843-850).

Se puede observar paresia de los miembros posteriores la cual puede evolucionar a una parálisis progresiva e hiperextensión rígida, esta hiperextensión en algunos casos llega a ser tan marcada que el miembro no puede ser flexionado incluso bajo anestesia, los animales que presenta parálisis del tren posterior pueden estar alertas y sobrevivir por meses. La paresia del tren posterior puede ser unilateral o bilateral, y la parálisis puede ser flácida o espástica, también se ha descrito mialgia, la cual es común en los músculos cuádriceps y lumbares, aunque de igual manera son mencionados los músculos abdominales, gastronemio, masetero y diafragma (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

La causa de la hiperextensión de los miembros posteriores no es conocida con certeza, pero se cree que responde a la combinación de parálisis de la neurona motora superior con miositis, resultando en una contractura fibrosa progresiva de los músculos y fijación de las articulaciones (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

La paresia, signo clínico comúnmente reportado, discurre con poliradiculitis, meningoencefalitis y polimiositis. En el SNC, ocurre meningoencefalitis multifocal no supurativa, con focos de necrosis en la sustancia gris (asociados a infiltrado peri vascular y gliosis) y de forma menos evidente necrosis de la sustancia blanca (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Otras disfunciones que suelen observarse en el paciente afectado, es la dificultad para tragar (Disfagia), parálisis de la mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e incluso miocarditis, dermatitis y neumonía; fiebre, inapetencia y muy raras veces la incontinencia urinaria y fecal ya que pueden desarrollarse conforme avanza la enfermedad (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Pancreatitis, hepatitis y adenitis pueden ocurrir siempre y cuando los taquizoítos hayan causado necrosis en dichos órganos, causando vómitos y polidipsia (falla renal, hepática e incontinencia) como complicaciones de los casos neuromusculares. También han sido reportadas algunas alteraciones oculares tales como reflejo pupilar lento, anisocoria, estrabismo, ptosis y nistagmo (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.6.1.2 Bovinos

● Bovinos adultos

En los bovinos adultos, el aborto es el único signo clínico observado en las hembras gestantes infectadas, aunque la mayor parte del ganado adulto es capaz de controlar la infección y permanecer clínicamente normal aunque este infectado. El aborto puede producirse tanto en novillas como en vacas y, aunque no se ha diagnosticado en animales mayores de once años, se desconoce la existencia de relación entre la edad de los animales y su receptividad a la infección (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

La fertilidad después del aborto no se ve afectada y el celo vuelve normalmente, entre el 5 y el 6% de estos animales pueden abortar

nuevamente, durante la gestación siguiente o en otras posteriores, sin embargo, la transmisión repetida de la infección desde las madres infectadas a la descendencia es frecuente, los abortos pueden producirse en cualquier época del año y presentarse de forma esporádica, endémica o en forma de brotes epidémicos, pero sin síntomas previos de enfermedad (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

● Feto

La infección fetal puede producirse en cualquier momento de la gestación, pero las consecuencias para el feto son más graves al comienzo de ésta. En los primeros momentos de la gestación, puede ocurrir la muerte del embrión o del feto en el útero y su reabsorción. Generalmente, el aborto tiene lugar entre el 3er y el 9º mes de la gestación, siendo más frecuente a los 4 y 7 meses (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

● Terneros

La transmisión vertical vía transplacentaria (que con frecuencia ocurre repetidamente en el mismo animal) se produce tanto en animales en los que no se observa patología abortiva como en aquellos individuos que han abortado (Álvarez García, 2003, pp. 2-85). La infección congénita en algunos rebaños se han señalado tasas de infección congénita que oscilan entre el 48%, el 90% (Álvarez García, 2003, pp. 2-85) y hasta un 95% permanecen clínicamente normales Sáenz Aguirre (2008, pp. 9-23) y sólo en un pequeño porcentaje, alrededor de 5%, ocurre muerte fetal (Granillo y Martínez, 2008, pp. 1-32).

La transmisión vertical ocurre durante el tercer trimestre cuando hay altos niveles de progesterona asociada a la respuesta Th2 incapaz de controlar al protozoo. En contraste, un reciente trabajo realizado por Rettigner, De Meerschman, Focant, Vanderplasschen y Losson (2004, pp. 149-160) menciona que la reactivación parasitaria sería espontánea e independiente de la respuesta inmune. Sin embargo, ese mismo trabajo sugiere que el ambiente

presente en la interfase materno-fetal favorecería el paso de N. caninum a través de la placenta (Fernández Chaparro, 2010, pp. 1-41).

Las consecuencias de la infección transplacentaria (vertical) en las vacas gestantes son diferentes en función del momento de la gestación en las que ésta tiene lugar. Si la infección ocurre durante el primer tercio de la gestación, etapa en la cual el feto no es inmunocompetente, la consecuencia es la muerte fetal. Si la infección se produce en el segundo tercio, cuando el sistema inmunitario aún no es maduro, las consecuencia puede ser el aborto o el nacimiento de terneros congénitamente infectados. Finalmente cuando la infección ocurre en el último tercio, generalmente se da el nacimiento de terneros aparentemente sanos pero congénitamente infectados (Fernández Chaparro, 2010, pp. 1-41).

El nacimiento de terneros infectados clínicamente sanos son asintomáticos, hasta un 95% de los terneros infectados pueden nacer clínicamente normales, los cuales son seropositivos y pueden transmitir la infección a su descendencia. A pesar de ser la infección subclínica la forma más frecuente de presentación de la neosporosis congénita, también se han descrito algunos casos de terneros infectados congénitamente que presentaron sintomatología nerviosa como consecuencia de la presencia de quistes tisulares en el SNC (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los terneros que son infectados congénitamente y que presentan sintomatología nerviosa, el tiempo de vida desde el nacimiento es de cuatro semanas, los primeros signos clínicos aparecen frecuentemente a los 4 - 5 días del parto o se retrasan hasta las 2 semanas, los terneros suelen presentar problemas neuromusculares muy variables desde incoordinación ligera hasta parálisis completa, debilidad y dificultad para levantarse (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los miembros anteriores y/o posteriores están flexionados o hiperextendidos, el examen neurológico revela ataxia, disminución del reflejo patelar y pérdida de

coordinación. En ocasiones hay exoftalmia, posición asimétrica de los ojos y otras deformaciones asociadas con la lesión de las células nerviosas embrionarias (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.6.1.3 Equinos

En equinos, se han observado casos de enfermedad neurológica como: ataxia asimétrica progresiva y debilidad de los miembros posteriores (Rodríguez Romero, 2009, pp. 1-41).

2.6.1.4 Ovinos y Caprinos

Los signos clínicos en las dos especies son similares a los presentados en los bovinos, nacimiento de crías débiles, con incapacidad para mantenerse en pie, movimientos de pedaleo de las extremidades anteriores y elevación de la temperatura corporal (Rodríguez Romero, 2009, pp. 1-41).

2.6.1.5 Ratones

La enfermedad presenta dos etapas bien diferenciadas:

En los primeros días tras la infección, los ratones permanecen inmóviles, con el raquis encorvado, muestran dificultad respiratoria y erizamiento del pelo, debido posiblemente a un estado febril, cuando la infección es muy grave, mueren en esta fase (Pérez Zaballos, 2004, pp. 1-24).

En la fase crónica (a partir de la segunda semana p.i.) los ratones añaden a la sintomatología ya expuesta, los signos nerviosos, con debilidad y dificultad para el movimiento que va desde la debilidad en el tercio posterior hasta su parálisis, de igual manera presentan torneo, ataxia y temblor de cabeza, todos estos síntomas se ven acompañados de pérdida de peso y apatía (Pérez Zaballos, 2004, pp. 1-24).

2.6.2 Lesiones Histopatológicas

Las principales lesiones observadas en caninos neonatos son neumonía, miocarditis, hepatitis, necrosis muscular y encefalomielitis, también hay relatos esporádicos de infección ocular, úlcera de mucosa oral y dermatitis ulcerativa. Las lesiones macroscópicas son áreas de hemorragia y necrosis multifocal de los órganos afectados, granulomas en vísceras, estrías blanquecinas en los músculos (principalmente del diafragma) y megaesófago. En los casos más severos puede haber hipotrofia y fibrosis muscular (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Microscópicamente, los taquizoítos se los puede encontrar aislados o aglomerados en todos los tejidos, una infiltración focal de células mononucleares rodeando un área central de necrosis es la lesión característica de neosporosis en el SNC. Es común la presencia de quistes con o sin reacción local; casos de dermatitis nodular, polimiositis y encefalitis multifocal son descritas en caninos entre 18 meses y los 6 años de edad (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.6.3 Respuesta Inmunológica

Debido a la cercanía filogenética entre N. caninum y T. gondii, y a la similitud entre algunas de sus moléculas, se ha iniciado el uso de una denominación común para ambos parásitos. T. gondii posee una familia de al menos 8 antígenos denominados SAG (antígenos superficiales) y SRS (secuencias relacionadas a SAG1). N. caninum expresa antígenos inmunodominantes semejantes a ellos (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

El SAG1 de N. caninum, NcSAG1, es una proteína de 29/36 kDa, localizada sólo en la superficie de los taquizoítos, y estaría involucrada en la adherencia preinvasión. Otra proteína, NcSRS2 de 35/43 kDa, se ubica en la superficie de bradizoítos y taquizoítos, que de igual manera realizan una función similar. Si bien las proteínas de estos parásitos muestran secuencias bien conservadas,

localización, y probablemente función similar, éstas son antigénicamente diferentes (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Existe un segundo grupo de proteínas localizadas en los gránulos densos de ambos géneros denominadas GRA, y parecen estar relacionadas al funcionamiento de la vacuola parasitófora (VP), la cual se forma durante la invasión y se deriva del parásito y la célula hospedera. Se han identificado NcGRA7 (33 kDa) y NcGRA6 (37 kDa), asociadas a la membrana de la VP y a la red vacuolar (Álvarez, 2003), además, en los gránulos densos se aisló una potente hidrolasa (NTPasa) que posee su homóloga en los gránulos densos de T. gondii, su función aún no ha sido determinada (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Se desconoce si el tipo de respuesta inmune generada por la ingestión de ooquistes es similar a la observada con la inoculación de taquizoítos, aunque existe evidencia de variación antigénica entre estadíos de taquizoítos y bradizoítos. Se ha demostrado que N. caninum induce a respuesta inmune humoral y celular en los animales infectados, la presencia de anticuerpos probablemente no asegura el control de la infección, lo cual parece depender más de los mecanismos inmunes mediadas por células (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

En la actualidad el ratón es el modelo animal más utilizado para el estudio de la respuesta inmune producida por N. caninum, el desarrollo de modelos murinos con inmunodeficiencias selectivas de origen genético ha sido de gran ayuda en el estudio de la inmunidad celular frente a la infección (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.6.3.1 Respuesta inmune humoral

Las infecciones naturales y experimentales en animales a partir de taquizoítos u ooquistes de N. caninum han permitido la caracterización de la inmunidad mediada por anticuerpos. En el caso de infecciones experimentales, en ratones se destaca la producción de IgG1 e IgG2a; una respuesta de tipo Th2 asociada

a la producción de altos niveles de IgG1, que a su vez esta estimulada por la IL-4, se ha relacionado con una mayor susceptibilidad y agravamiento de la infección (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Por el contrario la producción de IgG2a, dirigida principalmente por la IL-12 y el IFN-γ, es característica de una respuesta inmune de tipo Th1 y tiene un papel crucial en las fases iniciales de la infección interviniendo en la eliminación del parásito. Se ha postulado que el desarrollo de anticuerpos específicos probablemente limita la parasitemia o facilita la lisis de los taquizoítos extracelulares (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Ratones deficientes de células B, sin la capacidad de sintetizar anticuerpos, murieron presentando lesiones de encefalitis necrotizante multifocal cuando fueron inoculados con N. caninum. Diferentes estudios han descrito que luego de la infección, los anticuerpos predominantes son del isotipo IgG2 siendo bajos o nulos los niveles de IgG1. Se observó un aumento de mortalidad en ratones con elevada proporción IgG1:IgG2 (Álvarez García, 2003, pp. 2-85; Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.6.3.2 Respuesta Inmune Celular

Los mecanismos dependientes de la inmunidad mediada por células son importantes para controlar un parásito intracelular obligado como N. caninum, especialmente por su habilidad para evadir la respuesta inmune (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

En ratones, la infección provoca la estimulación de la respuesta celular con la producción de IFN-γ; los macrófagos, las células NK y las células dendríticas responden tras la infección, liberando citoquinas como la IL-12, IL-10, IL-4, el IFN-γ y el TNF-α, que junto con los linfocitos CD4+ y CD8+ intervienen en la regulación del balance de la respuesta celular Th1/Th2, este balance es crucial en la respuesta protectora desarrollada frente al parásito (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

El IFN-γ y la IL-12, responsables de una respuesta de tipo Th1, tienen efecto sinérgico y están implicados en el control de la neosporosis aguda, su depleción origina un aumento de la susceptibilidad de los ratones a la infección. Por otro lado, la IL-4 está relacionada con una respuesta de tipo Th2 y con el progreso de la enfermedad, razón por la cual una posible estrategia para disminuir la transmisión congénita es neutralizar la producción de IL-4, favoreciendo de esta forma la producción de IFN-γ e IL-12 (Álvarez García, 2003, pp. 2-85; Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Ambas poblaciones de linfocitos T, CD4+ y CD8+, juegan un papel importante en la prevención de la infección en las fases más avanzadas, las células T CD8+ son parcialmente responsables de la protección frente a N. caninum, deben tomarse en cuenta dos mecanismos en función de la fase de la infección: en una fase temprana destaca la participación de IFN-γ producido por las células T activadas como primera línea de defensa, destruyendo a los parásitos intracelulares y aumentando así la resistencia a la infección (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En fases más avanzadas de la infección, las células CD4+ jugarían un papel más importante que el IFN-γ, al inicio de la interacción, las células CD4+ (activadas por el IFN-γ) originan una respuesta inmune de tipo Th1, activando a su vez a las células CD4 citotóxicas que se encargan de destruir las células infectadas con el parásito. Las células CD4+ también serían responsables de la disminución de la tasa de mortalidad, ya que además intervienen en la producción de altos niveles de anticuerpos (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

2.6.3.3 Infección aguda

Los taquizoítos son las formas de multiplicación rápida del parásito, estos se multiplican intracelularmente en muchos tipos de células, mostrando mayor tropismo por las del Sistema Nervioso Central (SNC), de la placenta, células musculares esqueléticas, cardíacas y células endoteliales (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

La Patogénesis de la neosporosis depende del equilibrio entre la capacidad del taquizoíto para penetrar y multiplicarse en las células y la habilidad del hospedador para inhibir la proliferación del parásito. La multiplicación intracelular del parásito causa la destrucción tisular y la aparición de focos de necrosis, como consecuencia de este daño, se produce una reacción inflamatoria, dando lugar a la infiltración del tejido lesionado con células inflamatorias, principalmente mononucleadas (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

El aborto, en los bovinos adultos es el único signo clínico observado en las hembras gestantes en la fase aguda, la muerte del feto se podría producir como consecuencia de las lesiones necróticas e inflamatorias en la placenta o el feto, durante la parasitemia, los taquizoítos colonizan al feto en donde causa lesiones a nivel de cerebro, corazón e hígado y con menos frecuencia en pulmones, riñones y membranas fetales (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

Figura No 5. Invasión de un taquizoíto de T. gondii a una célula hospedadora.
Nota: proceso muy similar al que realiza N. caninum.
Adaptado de: (Weiss y Kim, 2007, p. 24).

En los mecanismos de adhesión y penetración del parásito en la célula, se ha observado la implicación de una serie de receptores de superficie y proteínas del taquizoíto secretadas por los micronemas, las roptrias y los gránulos densos (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

Durante la invasión celular, el taquizoíto se reorienta y su extremo apical contacta con el plasmalema de la célula, en ese primer contacto están involucrados antígenos inmunodominantes de superficie como: NcSRS2, por parte del parásito y residuos de conroitín sulfato por parte de la célula hospedadora (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

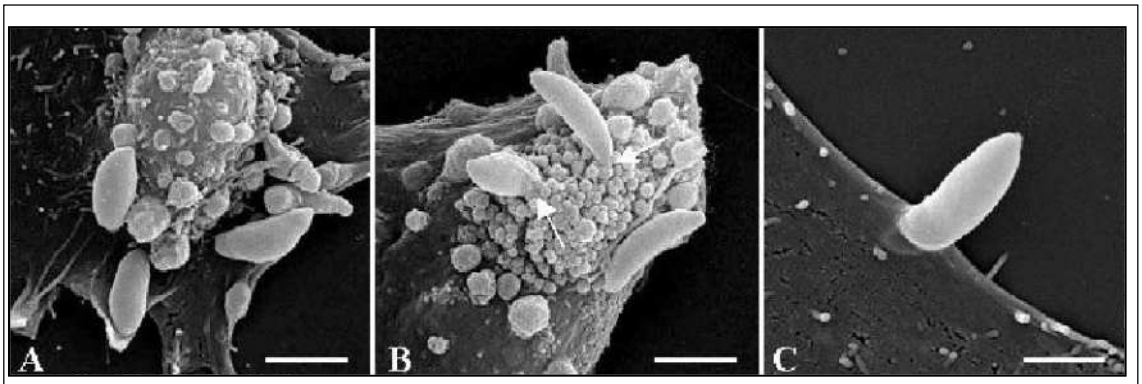


Figura No 6. Adhesión e invasión celular de N. caninum
Nota: (A) adhesión, (B) reorientación y (C) penetración del extremo apical del taquizoíto.
Adaptado de: (Vonlaufen, 2003, p. 11).

En la fase de penetración, el conoide emerge, la membrana de la célula comienza a invaginarse y se secretan a su interior una serie de enzimas proteolíticas como las de tipo aspartil, junto con proteínas de adhesión secretadas por los micronemas (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

Estas últimas ayudarían a formar una zona de unión móvil entre la membrana extrema del parásito y el plasmalema de la célula, la cual se desplaza hacia la parte posterior del taquizoíto, impulsándolo al interior de la célula, de esta forma el taquizoíto quedaría englobado en la vacuola parasitófora, formada conjuntamente por la célula hospedadora y el parásito (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

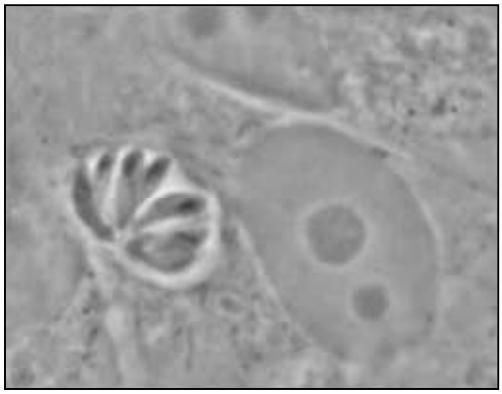


Figura 7. Vacuola Parasitófora englobando taquizoítos de N. caninum
Adaptado de: (Risco Castillo, 2008, p. 4).

2.6.3.4 Infección Crónica y Reactivación

Con el desarrollo de la inmunidad, los taquizoítos se transforman en bradizoítos (fase de multiplicación lenta) formando los quistes tisulares localizados en el SNC. Este estadio es el que se mantiene durante la fase crónica de la infección, los quistes con bradizoítos no ocasionan una acción patógena destacada, por lo que el animal no desarrolla ninguna sintomatología. Sin embargo, los factores que provocan un estado de inmunodepresión en el animal podrían desencadenar la reactivación de la infección. En estos casos, los bradizoítos se liberarían de los quistes transformándose en taquizoítos y se desarrollaría nuevamente la fase aguda de la infección (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

Una de las posibles explicaciones de la reactivación en la gestación, estaría dada por el efecto inhibitorio de la progesterona sobre la producción del óxido nítrico (NO), del factor de necrosis tumoral-α (TNF-α), la activación de las células asesinas (NK) y el estímulo de un tipo de respuesta celular Th2). Tal situación tiene importantes repercusiones sobre la respuesta inmune del animal (Cruz Montenegro, 2011, pp. 3-51).

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Clínico

En los primeros años el diagnóstico de N. caninum estaba basado en la interpretación de los signos clínicos e histopatología, que describía lesiones en el SNC, músculos y otros órganos afectados. Sin embargo, esta forma de diagnóstico se confunde con T. gondii debido a las similitudes estructurales (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

La interpretación de los signos clínicos solamente representa un medio diagnóstico presuntivo, que se debe reforzar mediante la serología. No obstante se debe sospechar de neosporosis en caninos que presentan paresia del tren posterior y ataxia. De igual manera, una historia de enfermedad neuromuscular neonatal en más de un cachorro o más de una camada de una misma hembra, es sugerente de neosporosis (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.7.2 Laboratorio

2.7.2.1 Coprología

La presencia de ooquistes de N. caninum nunca han sido observados en caninos con una infección sistémica activa. Esto indica que el examen de heces (PCR) es probablemente de escaso valor diagnóstico para la enfermedad. Además la identificación de los ooquistes es dificultosa, debido a que los caninos infectados eliminan ooquistes sin esporular cuyo tamaño y morfología son similares a los de H. heydorni (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.7.2.2 Inmunohistoquímica

Bjerkas y Presthus (1989, pp. 459-468) utilizaron una técnica inmunohistoquímica cuando reportaron el primer caso de infección en caninos por un organismo parecido a T. gondii. Posteriormente, el primer test

inmunohistoquímico específico para detectar N. caninum fue un complejo inmunoperoxidasa, desarrollado para detectar al parásito en secciones de tejido alojados en parafina y fijados con formalina. En los años subsecuentes, nuevos tests inmunohistoquímicos fueron desarrollados para hacer un diagnóstico más específico. Además, la inmunohistoquímica ha sido utilizada para validar tests serológicos (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

La utilización de anticuerpos policlonales en la técnica de inmunohistoquímica puede ocasionar reacción cruzada con T. gondii. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales pero su utilización para la inmunohistoquímica aún no ha sido evaluada (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.7.2.3 Serología

N. caninum induce a la producción de anticuerpos en el hospedero, es por esta razón que un test serológico puede llegar a ser útil para detectar animales infectados. Estos anticuerpos pueden permanecer detectables por varios meses e incluso años, por esta razón un resultado positivo a anticuerpos, sólo indica exposición al parásito y no necesariamente enfermedad clínica (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

En ensayos serológicos, los títulos y valores de absorbancia son dependientes de la composición del antígeno, anticuerpos secundarios y otros reactivos. Además, los niveles o puntos de corte pueden ser arbitrariamente seleccionados para proveer la sensibilidad y especificidad requerida para una aplicación en particular. La edad y clase de un animal pueden también afectar la selección de un punto de corte (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Los principales tests serológicos utilizados para diagnosticar neosporosis han sido la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el enzimoinmuno ensayo (ELISA) y el inmunoblot. Sin embargo, IFI y ELISA son los más utilizados ya que son relativamente baratos y han mostrado una alta sensibilidad y especificidad (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

● Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La IFI fue el primer método diagnóstico desarrollado para suero canino y aún es el método más utilizado. En algunos casos se recomienda en combinación con el inmunoblot (IFI + IB) para clasificar un individuo como seropositivo o seronegativo a N. caninum, ya que no existe una técnica serológica que pueda ser considerada como "*gold standard"* (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Una característica importante del IFI es su habilidad para detectar los anticuerpos IgG e IgM producidos por el hospedero en respuesta a la infección por N. caninum, aunque en la actualidad el rol de los títulos de IgM en la demostración de infecciones agudas es aún desconocido (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

La IFI detecta, fundamentalmente, anticuerpos que se unen a los antígenos localizados en la superficie celular de N. caninum. El patrón de IFI varía cuando se analizan sueros con títulos bajos, reduciéndose considerablemente la fluorescencia o quedando restringida a la parte apical del taquizoíto. Sin embargo, estos resultados deberían interpretarse con cautela, ya que la fluorescencia apical también puede aparecer como resultado de reacciones cruzadas con T. gondii, ya que Eimeria spp, T. gondii y N. caninum contienen epítopos comunes asociados al complejo apical. Se observó una leve reacción cruzada con el suero de perros infectados con Babesia gibsoni, pero no con Babesia canis (Greene, 2008, pp. 843-850).

En prueba IFI se ha empleado como antígeno taquizoítos de N. caninum de aislados de origen bovino y canino, no existiendo evidencias de que las posibles diferencias antigénicas entre los diferentes aislados puedan afectar a la precisión de la prueba (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

Los títulos de IgG en la mayoría de las especies aumentan 1 o 2 semanas luego de la infección, por tal razón se recomienda realizar la prueba en ese tiempo, los anticuerpos maternos pueden pasarse desde la madre a la cría lo

cual ocasiona resultados falsos positivos; sin embargo, estos niveles desaparecen en los perros sin infección a los 32 días de vida (Greene, 2008, pp. 843-850).

La detección de anticuerpos mediante IFI no es indicativa de neosporosis clínica, Sin embargo, se ha propuesto que incluso una dilución sérica de 1/25 demuestra exposición al parásito. Un pequeño número de reacciones cruzadas entre N. caninum y T. gondii han sido reportadas en caninos naturalmente infectados (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Los puntos de corte empleados en la IFI varían entre los diferentes laboratorios y al comparar los resultados de la IFI con los obtenidos en otras pruebas diagnósticas (ELISA e inmunohistoquímica, principalmente) se han propuesto diferentes títulos de seropositividad en función de la especie y de la edad (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En relación a la serología canina, Se ha sugerido puntos de corte de 1/50 o mayor, el cual es considerado fuertemente sugestivo de neosporosis clínica, esto debido a que todos los casos confirmados de neosporosis que se han reportado han tenido títulos de 1/80 a más, estos títulos indican una infección reciente o reactivación; sin embargo, algunos cachorros congénitamente infectados, pueden tener títulos tan bajos como 1/10 (Flores Yánez, 2006, pp. 6-16).

En relación a la serología bovina, se emplean puntos de corte distintos en función de la edad, fetos y vacas. En la serología fetal los puntos de corte más aceptados varían desde 1:50 hasta 1:80, sin embargo González y otros (1999, pp. 145-150) han sugerido el empleo de diferentes puntos de corte en función de la edad gestacional del feto junto con conjugados anti-IgM para optimizar al máximo el rendimiento de la técnica. En el ganado bovino se han empleado puntos de corte que oscilan entre 1:200 y 1:640. Sin embargo, la sensibilidad de la prueba aumentó cuando se empleó un título de IFI de 1:50 para identificar los animales persistentemente infectados (Álvarez García, 2003, pp. 2-85).

En cuanto a los falsos positivos en bovinos se pueden dar por una infección reciente, la administración de vacunas previas como la Bovilis®Neoguard la cual deja títulos residuales que persisten con el tiempo y la transferencia de anticuerpos maternos; en caninos puede darse por una infección reciente, vacunación previa, reacción cruzada con T. gondii y la transferencia de anticuerpos maternos; los falsos negativos se pueden dar por presentar la enfermedad de manera latente en donde el animal posee bajas cargas parasitarias al momento de tomar la muestra (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

La prueba de IFI tiene una sensibilidad de 98% y una especificidad de 97% (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45). En el presente estudio al calcular el valor predictivo se obtuvieron los siguientes resultados: $\mathbf{VP^{+}}$= 0.54 y $\mathbf{VP^{-}}$= 0.99; esto nos indica que la prueba IFI posee un valor predictivo positivo del 54%, es decir que la mitad de los animales seropositivos están infectados (verdaderos positivos); y un valor predictivo negativo del 99%, en donde nos indica que casi todos los animales seronegativos están realmente sanos (verdaderos negativos).

● **Enzimoinmunoensayo (ELISA)**

El test de ELISA ha sido ampliamente utilizado en el serodiagnóstico de la neosporosis, este test brinda facilidad para procesar un gran número de muestras, la obtención de valores de sensibilidad y especificidad superiores a las obtenidas con IFI, y la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, han hecho de ella una prueba confiable (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

El punto de corte o el valor de absorbancia asignado a una prueba es motivo de discusión ya que depende de factores tales como composición del antígeno, anticuerpos identificados y de los conjugados utilizados. Un determinado punto de corte debería ajustarse a cada circunstancia o situación epidemiológica. Para optimizar la prueba, algunos autores han descrito que los taquizoítos formolizados preservan los antígenos de membrana e impiden la exposición de

antígenos internos, responsables de la reacción cruzada con otros Apicomplexa (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

En animales infectados experimental y naturalmente, la avidez de la IgG tiende a incrementarse con el curso de la infección, describiéndose un ELISA con inmunoestimuladores e incubación con urea, que permite identificar animales con infección crónica o recientemente infectados. La mayoría de los tests de ELISA desarrollados para el diagnóstico de neosporosis han sido desarrollados para evaluar suero vacuno, lastimosamente no son transferibles o útiles para la evaluación de suero canino (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

● **Microaglutinación**

La microaglutinación es una prueba serológica relevante en el diagnóstico de la neosporosis, no requiere conjugados de difícil adquisición y permite analizar sueros de diferentes especies simultáneamente. Tiene alta repetibilidad entre operarios, es barata, de fácil lectura y utiliza poco equipamiento y materiales. Comparando esta técnica con la de IFI, la sensibilidad y especificidad que se obtuvo fue 100% vs. 98% y 97% vs. 99% respectivamente (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.7.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR ha permitido un gran avance en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas por ser extremadamente sensible y específica. Fue gracias al PCR que se confirmó la taxonomía de N. caninum y su inclusión en la familia Sarcocystidae. También se logró demostrar que N. caninum tenía un alto grado de diferencia con T. gondii y otras especies de Sarcocystis spp. (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Estudios realizados confirman la utilidad del PCR como una importante herramienta en el diagnóstico específico y exacto. Igualmente se han desarrollado PCR múltiples para la detección del ADN de T. gondii y N.

caninum en muestras biológicas felinas y caninas de animales con evidencia serológica de toxoplasmosis y neosporosis (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.7.2.5 Diagnostico Post-mortem (Histopatológico)

El diagnóstico post-mortem está basado en la detección de lesiones causadas por los parásitos en caninos afectados. Las lesiones características de neosporosis son principalmente necrosis del SNC e hígado, con presencia de granulomas de más de 1cm de diámetro en tejidos viscerales, estriaciones blanco amarillentas en los músculos (especialmente en el diafragma), atrofia cerebral y dermatitis ulcerativa (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Las muestras tomadas pueden ser sometidas a histopatología utilizando tinciones ordinarias, estas pueden revelar lesiones sugestivas a neosporosis, los taquizoítos o los quistes tisulares pueden ser observados pero para la diferenciación con T. gondii y para la confirmación del diagnóstico, es necesario realizar ensayos serológicos con antígenos específicos (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.7.3. Alteraciones en Hematología y Bioquímica

Los resultados hematológicos y bioquímicos son variables y dependen del órgano implicado (Gómez y Guida, 2010, pp. 285-288).

En hematología, en el recuento diferencial leucocitario incluye: en números decrecientes linfocitos, monocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos (Greene, 2008, pp. 843-850). En algunos caninos, estos parámetros pueden estar dentro de los límites de referencia (Gómez y Guida, 2010, pp. 285-288). También se puede observar anemia, leucocitosis (linfocitosis, monocitosis), elevación de las proteínas séricas (Cordero y Rojo, 1999, pp. 668-669) y ácidos biliares (Ramsey y Teninant, 2006, pp. 330-342).

En bioquímica, en la enfermedad muscular, se ha observado un aumento en las actividades de la creatina cinasa (CK) y del aspartato aminotransferasa (AST) (Greene, 2008, pp. 843-850), es habitual encontrar estos niveles en pacientes con miositis (Ettinger y Feldman, 2007, pp. 642-643). Los caninos con inflamación hepática tienen un incremento de las actividades de la alanina aminotransferasa (ALT) y de la fosfatasa alcalina (FA) (Greene, 2008, pp. 843-850).

2.8 Prevención

La prevención debe ir encaminado fundamentalmente, a reducir la tasa de prevalencia de la infección en los criaderos caninos y en las explotaciones ganaderas que se ha detectado brotes positivos, de igual manera prevenir su propagación a otras, evitando tanto la transmisión horizontal como la vertical (López Pérez, 2010, pp. 13-16).

Con este fin, se han sugerido varias medidas como: mejora de la bioseguridad, introducción de alternativas en el manejo reproductivo, vacunación, eliminación de los animales seropositivos, inspección de los animales que entran y salen de los establecimientos, y por último, una infraestructura en donde no exista la posibilidad de contacto entre caninos y bovinos (López Pérez, 2010, pp. 13-16).

La escasa información referente a la sensibilidad in vitro de N. caninum a algunos antibióticos, ha permitido afirmar que no existe un tratamiento eficaz para combatir la enfermedad en bovinos, esto es debido a la dificultad de eliminar las formas quísticas tisulares, además del elevado costo que representa el tratar rebaños con una alta morbilidad.

A diferencia de los bovinos se conoce la existencia de un tratamiento rápido para la neosporosis canina, con cualquiera de los fármacos siguientes: Trimetropina, Sulfadiazina o Clindamicina (Patitucci et al., 2001, pp. 227-232).

2.8.1 Inmuprofilaxis

Lamentablemente, no existen estudios realizados referentes a la vacunación en la especie canina (Cornejo Prado, 2004, pp. 1-18); sin embargo, en los bovinos se ha experimentado con vacunas vivas, la cual induce a una mayor respuesta mediada por células CMI (Inmunidad Mediada por Células), obteniendo resultados positivos, pero este tipo de vacuna tiene varias desventajas como: costo elevado, corta vida, una estricta cadena de frío y el hecho que podría volverse virulenta Sáenz Aguirre (2008, pp. 9-23).

Actualmente, existe una vacuna inactivada llamada “Bovilis®Neoguard” la cual ha sido elaborada en base de taquizoítos de N. caninum en adyuvante sintético (Havlogen); fue desarrollada con el fin de disminuir el porcentaje de abortos Sáenz Aguirre, (2008, pp. 9-23), está recomendada en casos donde se estime que la tasa de abortos se debe principalmente a esta etiología, caso contrario deberá llevarse primero un control para los otros entes patológicos que están presentes como IBR (Rinotraqueitis Infecciosa Bovina), DBV (Diarrea Viral Bovina), Leptospirosis y brucelosis (Gamón, 2010, pp. 2-19).

“Bovilis®Neoguard” es una vacuna para uso en vacas gestantes sanas como auxiliar en la reducción del aborto causado por N. caninum, contiene protozoarios muertos de N. caninum, con SPUR® como adyuvante que contribuye a su alta inmunogenicidad y estabilidad, estimulando una respuesta de células blanco y una respuesta celular adecuada Sáenz Aguirre (2008, pp. 9-23), la dosis total que se debe aplicar es de 5 ml vía subcutánea, se recomienda aplicar durante el primer trimestre de la gestación, seguido de una segunda aplicación a las 3 ó 4 semanas. Se recomienda la revacunación con dos dosis en las gestaciones subsecuentes (Gamón, 2010, pp. 2-19).

Al momento de utilizar la vacuna se debe tener en cuenta las siguientes precauciones según, Gamón (2010, pp. 2-19):

- Mantener en refrigeración a temperatura entre 2 y 8 °C.

- No congelar.
- Aplicar en animales sanos.
- Antes de utilizar, debe alcanzar la temperatura ambiente (15 a 25 °C).
- Agitar bien antes y durante su uso.
- No se debe exponer a los rayos del sol por tiempo prolongado.
- Utilizar jeringas y agujas estériles.
- En caso de observar reacciones alérgicas, usar epinefrina como antídoto.
- Desechar el frasco mediante incineración.

Se recomienda vacunar sólo en hatos con clara problemática de neosporosis, donde la tasa de abortos sea de 8% o más y la seropositividad sea del 20% o más. La vacuna no requiere de precauciones especiales (Campero, 2006, pp. 430-434).

Es importante destacar que la vacunación deja títulos residuales los cuales persisten en el tiempo dificultando el conocimiento del verdadero status de la infección, no existe una prueba que permita diferenciar a los animales vacunados de los animales naturalmente infectados, por tal razón es imposible seguir el estatus de la infección. Los animales vacunados no deberían introducirse en los hatos libres de la enfermedad (Campero, 2006, pp. 430-434).

En cuanto a la detección de falsos positivos y negativos, siempre será de utilidad realizar nuevamente la prueba a la madre y a su cría después de un período de 3 a 4 semanas, esto en el caso de transmisión vertical, de igual manera es útil analizar a las vacas falsas negativas en la segunda mitad de la gestación, ya que hay un incremento en los títulos de anticuerpos al final de la gestación (Campero, 2006, pp. 430-434).

2.9 Control

2.9.1 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, usar para reposición sólo terneras nacidas de vacas seronegativas. Si se realiza trasplante de embriones, comprobar que las receptoras sean seronegativas (Jiménez Santizo, 2010, pp. 6-16).

2.9.2 Control de la transmisión horizontal

Impedir el acceso de roedores, caninos y animales silvestres a lugares destinados al depósito de alimento para el ganado (depósitos de granos, galpones, silos, etc.), pasturas y bebederos, para evitar la contaminación orofecal. Rápida eliminación de placentas, fetos abortados y animales muertos para evitar su ingestión por carnívoros. Desinfección de los materiales y áreas contaminadas por el aborto (Jiménez Santizo, 2010, pp. 6-16).

2.9.3 Control de la Neosporosis en caninos

Evitar el contacto de los caninos con el ganado, distribuyendo a las dos especies en áreas aisladas (Fernández Chaparro, 2010, pp. 1-41). Impedir el acceso de roedores, y animales silvestres a lugares destinados al depósito de alimento para los caninos (alimento balanceado comercial) y bebederos, para evitar la contaminación orofecal (Jiménez Santizo, 2010, pp. 6-16).

Realizar obligatoriamente a todos los caninos que habiten en la producción ganadera o criadero, el examen serológico de neospora dos veces por año con el fin de asegurar su negatividad. De igual manera realizar chequeos generales dos veces por año, en donde incluyan exámenes hematológicos con el fin de saber el estado inmulógico de los animales, sobre todo las hembras para evitar su inmunosupresión y susceptibilidad a enfermedades secundarias, ya que los

caninos inmuno-suprimidos liberan más ooquistes en materia fecal (Jiménez Santizo, 2010, pp. 6-16).

Se recomienda que no se alimente a los caninos con carne cruda, ya que probablemente es una ruta de infección post natal (especialmente la carne bovina), de igual manera evitar que los caninos ingieran material abortado (feto, placenta), realizar desinfección de los materiales y áreas contaminadas (Jiménez Santizo, 2010, pp. 6-16).

Evitar la reproducción de las hembras seropositivas, ya que pueden transmitir la enfermedad a su descendencia, se han observado hembras con títulos de 1:50 en la (IFI) que han producido cachorros afectados (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45), por lo tanto se recomienda realizar una evaluación serológica a cada cachorro antes de su venta, ya que los perros jóvenes eliminan más ooquistes después de la infección a diferencia de los perros adultos (Jiménez Santizo, 2010, pp. 6-16).

2.9.4 Control de la Neosporosis en bovinos

Realizar un muestreo de al menos el 10% de las vacas sanas, paridas y en ordeño, dos veces por año, con el fin de conocer el nivel de infección (Patitucci et al., 2001, pp. 227-232). Es importante identificar, aislar y realizar pruebas serológicas a las vacas que hayan abortado, si estas llegan abortar por segunda vez es mejor eliminarlas (Patitucci et al., 2001, pp. 227-232; Jiménez Santizo, 2010, pp. 6-16).

Si en los resultados la seroprevalencia de la enfermedad es baja, es preferible eliminar las vacas seropositivas, para lograr erradicar a la enfermedad de la producción. Es importante también realizar la serología de todo bovino que ingrese al establecimiento, incluidos los animales importados en pie (Patitucci et al., 2001, pp. 227-232).

Seleccionar a la terneras seronegativas para efectuar la reposición (Jiménez Santizo, 2010, pp. 6-16), se debe hacer serología de las terneras recriadas a los 5-6 meses de vida, cuando los anticuerpos calostrales maternos hayan desaparecido para evitar interferencia en la reacción serológica, las terneras o vacas positivas deberán destinarse a engorde y posterior faena (Patitucci et al., 2001, pp. 227-232).

A las vacas seronegativas gestantes se recomienda utilizar la vacuna "Bovilis®Neoguard" durante el primer trimestre de la gestación, seguido de una segunda aplicación a las 3 ó 4 semanas, realizar la revacunación con dos dosis en las gestaciones subsecuentes (Gamón, 2010, pp. 2-19).

2.10 Tratamiento

De manera general, los caninos infectados por N. caninum tienen mayor probabilidad de sobrevivir cuando los signos del SNC son menos severos en etapas tempranas de la enfermedad. La desaparición de los signos clínicos suele darse luego de una o dos semanas después de haber instaurado el tratamiento (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

El temprano reconocimiento de la infección e inicio del tratamiento específico son esenciales para un resultado clínico positivo. La muerte puede ser evitada en cachorros con compromiso severo de los miembros posteriores, aunque la función motora de estos usualmente no regresa a la normalidad (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

Las drogas que inhiben la multiplicación de T. gondii, también son eficaces contra N. caninum. Estas drogas son efectivas contra taquizoítos en cultivos celulares, pero hasta el momento no hay drogas eficaces contra los quistes tisulares. Los tratamientos descritos para la neosporosis consisten de la combinación de trimetoprim, pirimetamina, sulfonamidas y clindamicina. El grado de éxito de estos tratamientos es usualmente bajo, aunque existe un reporte de resolución completa de signos clínicos en un canino adulto con la

administración combinada de 1mg/Kg/día de pirimetamina y 20mg/Kg/día de sulfadoxina durante un mes (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

La neosporosis canina neonatal es tratada con clindamicina oral (15 - 22 mg/Kg/12hrs, durante 4 a 8 semanas). La combinación de pirimetamina oral (0.25 - 0.5 mg/Kg) y una sulfonamida oral (preferiblemente sulfadiazina; 30 mg/Kg) cada 12 horas por 2 a 4 semanas es también efectiva (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

El uso sinérgico de pirimetamina y sulfonamidas eventualmente origina una supresión de la médula ósea, la cual puede ser corregida con la adición de ácido fólico (5mg/día) o levadura (100mg/Kg/día) en la dieta del animal. Es importante anotar que no hay tratamiento para prevenir que una hembra canina infectada trasmita la infección a sus cachorros (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

2.11 Aspectos en la Salud Pública (Zoonosis)

Hasta la actualidad no se ha reportado a N. caninum, como enfermedad zoonótica. Estudios realizados por Graham, Calvert, Whyte y Marks (1999, pp. 672-673) y Petersen y otros (1999, pp. 278-280), no detectaron la presencia de anticuerpos contra el parásito, en donadores de sangre y mujeres con historial de aborto, respectivamente.

Por otro lado, los estudios realizados por Tranas, Heinzen, Weiss y McAllister (1999, pp. 765-767) y, Trees y Williams (2000, pp. 891-893), mostraron bajas seroprevalencias de 6.7 y 0.4% en muestras de donadores de California y de granjeros y mujeres con abortos recurrentes de Inglaterra (Rodríguez Romero, 2009, pp. 1-41). Sin embargo, existe la posibilidad que sea subdiagnosticado como toxoplasmosis. Se considera que tiene un potencial zoonótico debido a que experimentalmente se ha logrado infectar a 2 monos Rhesus (Granillo y Martínez, 2008, pp. 1-32).

Las consecuencias de la infección humana pueden ser serias considerando la infección congénita sucesiva de caninos y bovinos, estudios serológicos negativos post exposición a Neospora caninum en humanos sugiere que no es una zoonosis bajo condiciones naturales (Flores Yanez, 2006, pp. 6-16).

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño de Estudio

3.1.1 Ubicación

Esta investigación es un estudio de cohorte transversal, enfocada al diagnóstico diferencial en la práctica de pequeñas especies, ha sido desarrollado debido a la poca información existente sobre neosporosis en caninos, y podría ser utilizada como línea de base para el desarrollo de un programa de control.

Este estudio se realizó en dos clínicas veterinarias, el Hospital Veterinario "Mascotas" ubicado en la parroquia Cotocollao, en donde acude un promedio de 220 pacientes al mes y la Clínica Veterinaria "Perros & Gatos" ubicado en la parroquia Jipijapa, en donde acude un promedio de 250 pacientes al mes, las muestras tomadas fueron analizadas en el laboratorio LIVEXLAB ubicado en la parroquia el Inca, todos los establecimientos antes mencionados se encuentran al Norte del Distrito Metropolitano de Quito, Provincia de Pichincha, en el Cantón Quito.

3.2 Materiales

3.2.1 De Campo

3.2.1.1 Material Biológico

Para el trabajo de campo, se muestrearon 100 caninos en total, entre las dos clínicas veterinarias anteriormente mencionadas, Grupo A: Hospital Veterinario "Mascotas" (n=75) y Grupo B: Clínica Veterinaria "Perros & Gatos" (n=25) (Anexo N° 5), el criterio de inclusión para la unidades experimentales fue:

- La procedencia: nacido en Quito, otra provincia u otro país
- Entorno: Ciudad y campo
- Género: machos y hembras
- Edades: todas las posibles,
- Razas: todas las posibles
- Signología neural: compatible o no compatible
- Uso o no de Glucocorticoides
- Contacto o no con bovinos
- Presencia o no de abortos;
- Tipo de alimentación: restos cocidos, semicocidos o crudos de carne bovina.

Los individuos que cumplieron con estos criterios de inclusión fueron distribuidos en dos grupos:

- Grupo A: Pacientes del Hospital “Mascotas” (n=75)
- Grupo B: Pacientes de la Clínica “Perros & Gatos” (n=25)

Se aplicó una encuesta a todos los propietarios de las unidades experimentales, el cual se utilizó para la identificación de factores de riesgo.

3.2.1.2 Materiales para la extracción de muestras sanguíneas

Materiales a utilizar (Anexo N° 7):

- Jeringas 3 ml estériles.
- Agujas 20GX1½” (raza grande), 23GX1¼” (raza pequeña).
- Tubos estériles sin anticoagulante (tubo rojo vacutainer).
- Torniquete.
- Guantes de diagnóstico.
- Torundas de Algodón.
- Gasas.
- Sablón.

- Cooler (Caja Térmica).
- Etiquetas de Identificación.

3.2.2 De Laboratorio

3.2.2.1 Materiales para la detección de títulos de anticuerpos mediante (IFI)

Materiales a utilizar (Anexo N° 7):

- 100 Tubos rojos vacutainer (2ml de muestra canina).
- 2 Gradillas para 50 tubos.
- 1 Cortador de placas.
- 50 Porta objetos.
- 100 Ependorf de 1,5 ml (Tapa a presión).
- 100 Tubos de ensayo (estériles).
- 100 Puntas Azules estériles de 50 a 1000 UL para dilución.
- 100 Puntas Amarillas estériles de 1 a 200 UL para muestra.
- 2 Pipetas Automáticas.
- 1 Cámara Húmeda.
- 1 Toalla húmeda.
- 1 Paquete de buffer de Lavado en polvo (para preparar).
- 1 Probeta de 100 ml.
- 1 cucharita-espátula.

● Equipos (Anexo N° 7)

- 1 Centrífuga de 2000 rpm.
- 1 Vortex (Agitador).
- 1 Estufa (Incubadora).
- 1 Microscopio de Fluorescencia.
- 1 Balanza para laboratorio.

- **Microscopio de Fluorescencia:** Para el desarrollo de la prueba se necesita de un buen microscopio provisto de un condensador de campo oscuro, con una fuente luminosa especial, el cual posee un bombillo de mercurio que produzca luz ultravioleta y de varios filtros específicos, por lo tanto, cada sistema está constituido por un filtro que suministra la luz a una cierta longitud de onda para excitar al fluorocromo y un segundo filtro barrera para excluir la luz excitante, que permite la transmisión de la iluminación fluorescente, de mayor longitud de onda. La fluorescencia alcanza la máxima excitación a 490 nm y emite la luz fluorescente alrededor de 520 nm. Las lámparas más utilizadas para lograr una buena estimulación son las de tungsteno o de mercurio de alta presión (Ramsey y Teninant, 2006, pp. 16-22).

● **Reactivos (Anexo N° 7)**

- 10 Láminas NC-1 Nespora caninum de 12 posillos c/u conservado a -20°c.
- 1 Anti-IgG1 canino marcado con isotiocianato de fluroesceína (FITC).
- Suero controlpositivo para N. caninum (PC-IFA-NC-CAN).
- Suero control negativo para N. caninum (NC-IFA-NC-CAN).
- 1 Fluido de Montaje (Glicerina Tamponada).
- 100 ml de Solución salina (para dilución).
- 500 ml de Agua destilada (preparación buffer de lavado).
- Buffer carbonato de lavado.

3.3 Métodos

3.3.1 De Campo

3.3.1.1 Sensibilización del propietario

Se proporcionó una charla informativa acerca del estudio a realizarse a cada propietario con el fin de que conozca la importancia de la neosporosis canina,

mencionando formas de contagio, quien es el hospero definitivo el cual es parte indispensable del ciclo del parasito, de igual manera la signología que se puede presentar, como llegar al diagnóstico, en qué consiste el tratamiento y las medidas de prevención.

Para reforzar la charla informativa se proporcionó un tríptico (Anexo N° 4) a todos los propietarios y se colocaron anuncios (Anexo N° 4) sobre la enfermedad en cada establecimiento, una vez que el propietario conozca el fin del estudio, se procederá a desarrollar la encuesta, carta de consentimiento y compromiso, para el inicio del chequeo general, la recolección de sangre y exámenes de laboratorio (si el paciente lo requiere).

3.3.1.2 Encuesta (Ficha Clínica) y Autorización

Para el mejor manejo de la información del paciente, se realizó el desarrollo de la encuesta (Anexo N° 2) el cual consta de: Información del propietario y del paciente; procedencia, donde habita, viajes al campo, signología compatible con la enfermedad, uso de glucocorticoides, convivencia con animales domésticos, abortos, tipo de alimentación; una ficha clínica en donde se anota todo lo del examen clínico; y por último la firma de autorización del dueño para la colecta de sangre.

Adjunto a la encuesta esta la carta de consentimiento (Anexo N° 2) en donde el propietario da la autorización de tomar una muestra a su mascota el cual será parte de este estudio; y la carta de compromiso (Anexo N° 3) en donde consta la entrega de los resultados del diagnóstico de su mascota, se especifica si en caso de que su mascota resultara positivo realizar el seguimiento del caso para concatenar estados patológicos y evolutivos aplicando pruebas laboratoriales como: hemogramas, bioquímica sanguínea, hepáticas y proteínas totales, si el paciente lo requiere administrar los medicamentos adecuados del tratamiento, siempre y cuando estos medicamentos corran por cuenta del propietario y por último brindar al propietario información sobre las medidas de control para evitar la propagación de la enfermedad.

3.3.1.3 Toma de Muestras

La toma de la muestra de sangre es de la vena cefálica, del cual se obtendrá 1ml de suero sanguíneo para ser analizados en el laboratorio mediante la prueba IFI; solo si el paciente presenta signología compatible con la enfermedad se tomara otra muestra de sangre para realizar hemograma y bioquímica sanguínea, con el fin de verificar los niveles de CK, ALT, AST, FA para tener en cuenta el estado general del paciente y se dará el respectivo tratamiento en donde el propietario correrá los gastos necesarios.

● Procedimiento para extracción de muestras sanguíneas

Para la obtención de una muestra sanguínea, se realizaron los siguientes pasos (Anexo N° 6):

1.- A nivel de radio, cubito y en la parte superior del codo se realizó un torniquete en el miembro anterior derecho o izquierdo para ayudar a la visualización de la vena cefálica, al momento de la extracción se desinfectó con un algodón empapado de sablón.

2.- Con una jeringa de 3ml con aguja estéril (20GX1½", razas grandes; 23GX1¼", razas pequeñas) se obtuvo 2 ml de sangre venosa.

3.- Se aplicó presión con el algodón en el punto de punción durante unos minutos y posteriormente se comprueba que no haya hemorragia en dicho punto.

4.- La muestra que se obtuvo del canino se almacenó en tubos estériles sin anticoagulante (tubo rojo vacutainer de 4ml), se las identificó apropiadamente y se los mantuvo en refrigeración en un cooler (Caja Térmica).

5.- Las muestras se analizaron en el laboratorio LIVEXLAB (Carlos Alvarado N50-09 y De Los Álamos (Sector El Inca), al norte de Quito), en donde se

realizó la determinación de anticuerpos Anti-Ig G1 canino (conjugado), los días lunes, miércoles y viernes de cada semana, la muestra se podía mantener en refrigeración durante 48 hrs sin alteración alguna.

3.3.2 De Laboratorio

3.3.2.1 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las muestras fueron analizadas mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, importado del laboratorio VMRD, Inc. Pullman, WA – USA. Las muestras se analizaron en el laboratorio LIVEXLAB, se detectó la presencia de anticuerpos con Anti-Ig G1 canino (conjugado), serán positivas si se observa la fluorescencia en todo el contorno del taquizoíto y negativas si hay fluorescencia parcial (apical) o ausente (Anexo N°1).

Al obtener los resultados, los pacientes que presentaron anticuerpos positivos, a los propietarios de estos pacientes se les recomendó realizar controles para concatenar estados patológicos y evolutivos, aplicando pruebas laboratoriales como: hemogramas, bioquímica sanguínea (hepática y Renal). Una vez que confirmemos que el paciente se encuentra en condiciones, se iniciará el tratamiento acompañado de un seguimiento el cual consiste en: chequeos semanales (Examen clínico) y al finalizar obligatoriamente se necesitara otro examen serológico para confirmar la eliminación total del protozoo, si en tal caso aún no se elimina completamente, se aumentara el tratamiento por dos semanas hasta confirmar su completa negatividad.

● Fundamento

La inmunofluorescencia indirecta o técnica de anticuerpos fluorescentes es un procedimiento especializado que consiste en una reacción antígeno-anticuerpo hecha visible por la incorporación de un colorante fluorescente (isotiocianato de fluoresceína ó Tetrametil rodamina) al anticuerpo, y una vez hecha la reacción,

se expone a la luz ultravioleta emitida por el microscopio para ser evidenciado por el fenómeno de fluorescencia (Ramsey y Teninant, 2006, pp. 16-22).

La detección de títulos de anticuerpos séricos mediante inmunofluorescencia indirecta es el primer método diagnóstico desarrollado para caninos y es aun el más usado. Una característica importante del IFI es su habilidad para detectar los anticuerpos IgG e IgM producidos por el hospedero en respuesta a la infección por N. caninum, aunque en la actualidad el rol de los títulos de IgM en la demostración de infecciones agudas es aún desconocido (Ruiz Ríos, 2009, pp. 26-45).

● Procedimiento para la detección de títulos de anticuerpos mediante (IFI)

Los anticuerpos contra Neospora caninum fueron determinados mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), se realizó el siguiente protocolo (Anexo N°8):

1.- Para obtener el suero, se centrifugó la sangre a 2000 rpm por 5 minutos.

2.- Iniciamos con la extracción de 20 µl del suero problema (Paciente) y lo mezclamos con la dilución 1/50 (980 µl de solución salina), para confirmar los pacientes positivos se utilizó12.5 µl de suero problema y lo mezclamos con la dilución 1/80 (987.5 µl de solución salina).

3.- Adicionamos 20 µl de dilución 1/50 ó 1/80 en cada pocillo de la placa de inmunofluorescencia que portan células vero y taquizoítos de N. caninum fijados.

4.- Se colocó la placa con la dilución en cada pocillo en la cámara húmeda, la cual se llevó a la incubadora y se dejó en la estufa a 37°C por 30 minutos.

5.- Se utilizó Buffer de lavado para IFI en la placa con el fin de eliminar los restos de anticuerpos no complementados, se lavó 6 veces con agitación leve,

se roció nuevamente el buffer y posteriormente se dejó por 10 minutos a temperatura ambiente y por último secado de la lámina.

6.- Se adicionó 20 µl de conjugado anti-Ig G1canino en cada pocillo, protegiéndolo de la luz.

7.- Nuevamente se colocó a la placa el conjugado en cada pocillo en la cámara húmeda, la cual se lleva a la incubadora y se deja en la estufa a 37°C por 30 minutos.

8.- Se utilizó Buffer de lavado para IFI en la placa, se lavó 6 veces con agitación leve, se roció el Buffer y posteriormente dejar por 10 minutos a temperatura ambiente y por último secado de la lámina.

9.- Por último se adicionó una microgota de fluido de montaje (glicerina tamponada) en cada pocillo, posteriormente se cubre con una laminilla cubreobjetos.

10.- Lectura con microscopio de inmunofluorescencia (100X).

Interpretación: Se determinó la positividad de la muestra al observarse fluorescencia completa del taquizoíto, considerándose negativas aquellas muestras con fluorescencia parcial (apical) o ausente.

3.4 Análisis Estadístico

3.4.1 Variables del Estudio

Según los resultados obtenidos a través de la utilización de la técnica de IFI, fueron asociados a las siguientes variables:

Tabla No 4. Variables del estudio.

Variables	Parámetros
Lugar de estudio	Hospital Mascotas; Clínica Perros & Gatos
Procedencia	Quito; otra ciudad; otro país
Entorno	ciudad; campo
Rango de edad	≤ 3; 4 – 7; ≥ 8
Género	hembras; machos
Raza	tamaño; utilidad
Signos Neurales	compatible o no a la enfermedad
Tipo de alimento	carne cruda; semicocida; cocido de bovino
Glucocorticoides	uso; o no
Convivencia con animales domésticos	caballo(s), cabra(s), cerdo(s) y oveja(s); gato(s); perro(s); vaca(s); perro(s) + vaca(s) y ninguno
Abortos	presencia; o no

3.4.2 Método Estadístico

El análisis de los resultados del estudio es mediante la utilización de herramientas de análisis estadístico descriptivo como:

- Medidas de tendencia central (Moda; Media; Mediana).
- Medidas de dispersión (Desviación estándar, Intervalo de confianza).

De igual manera el análisis de resultados mediante la utilización de herramientas de análisis estadístico inferencial como: Prevalencia, Prevalencia real de la enfermedad mediante la fórmula de Rogan-Gladen.

Posteriormente se realizó una comparación del Grupo A y Grupo B, las cuales están dentro de las variables estudiadas para identificar diferencias significativas a través del análisis de Chi2

Y por último el análisis del valor predictivo de la prueba, para determinar la validez de una prueba diagnóstica (sensibilidad y la especificidad) y seguridad (valores predictivos positivos y negativos) (Pita y Pertégas, 2013).

3.4.2.1 Método Descriptivo

● Medidas de tendencia central

1. Frecuencia Relativa

En Hospital "Mascotas", se calculó la frecuencia relativa de anticuerpos, para determinar el porcentaje de unidades experimentales seropositivas, haciendo uso de la siguiente fórmula, (Galindo, 2006, pp. 20-357):

$$f = \frac{a}{a+c} = \frac{5}{5+70} = 0.066$$

a: unidades experimentales seropositivas
c: total de unidades experimentales del grupo A

En la Clínica "Perros & Gatos", se calculó la frecuencia relativa de anticuerpos haciendo uso de la siguiente fórmula, (Galindo, 2006, pp. 20-357):

$$f = \frac{b}{b+d} = \frac{1}{1+24} = 0.04$$

b: unidades experimentales seropositivas
d: total de unidades experimentales del grupo B

En cuanto al total de todas las unidades experimentales, se calculó la frecuencia relativa de anticuerpos haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$f = \frac{6}{6+94} = 0.06$$

2. Moda

Se realizó el cálculo estadístico de la variable edad y raza haciendo uso de la siguiente fórmula, (Galindo, 2006, pp. 20-357):

$$MO = Liv + \frac{fi + 1}{(fi - 1) + (fi + 1)} \times ai$$

Liv: Límite inferior de la clase modal
fi: frecuencia absoluta de la clase modal
fi-1: frecuencia absoluta inferior de la clase modal
fi+1: frecuencia absoluta posterior de la clase modal
ai: amplitud de la clase

3. Media

Se realizó el cálculo estadístico de la variable edad haciendo uso de la siguiente fórmula, (Galindo, 2006, pp. 20-357):

$$\tilde{x} = \frac{\sum_{i-1}^{n} xi}{n}$$

n: número de la muestra
Σ: sumatoria del punto medio por la frecuencia

4. Mediana

Se realizó el cálculo estadístico de la variable edad haciendo uso de la siguiente fórmula, (Galindo, 2006, pp. 20-357):

$$Me = Liv + \frac{\frac{n}{2} - fi - 1}{fi} \times ai$$

$\boldsymbol{\frac{n}{2}}$**:** Semisuma de las frecuencias absolutas

fi-1: frecuencia acumulada anterior a la clase media

ai: amplitud de clase

● **Medidas de Dispersión**

1. Desviación Estándar

Se realizó el cálculo estadístico de la variable edad haciendo uso de la siguiente fórmula, (Galindo, 2006, pp. 20-357):

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(xi - \tilde{x})^2}$$

n: número de la muestra

Σ: sumatoria del punto medio por el promedio

2. Intervalo de Confianza

Se realizó el cálculo estadístico de la variable según el lugar de estudio comparando los datos del grupo A y B, basándonos en un porcentaje de confiabilidad de un 95% el cual representa el valor 1,96, haciendo uso de la siguiente fórmula, (Galindo, 2006, pp. 20-357):

$$Sem = \sqrt{\frac{P(1-P)}{n}}$$

n: número de la muestra
P: Prevalencia encontrada

3.4.2.2 Método Inferencial

● **Prevalencia**

La prevalencia para Neosporosis canina no había sido establecida antes en el Norte del Distrito Metropolitano de Quito.

Para el cálculo de la Prevalencia se utilizó la siguiente fórmula, (Cornejo Prado, 2004, pp. 1-18):

$$\text{Prevalencia de } Neospora\ caninum = \frac{\text{N° de casos de NC encontrados}}{\text{N° total de la población estudiada}}$$

$$\text{Prevalencia de Nc} = \frac{6}{100} \times 100 = 6\%$$

● **Prevalencia Real**

Para calcular la prevalencia real es necesario conocer previamente la sensibilidad y especificidad de la prueba y haciendo uso de la siguiente fórmula, (Pita y Pertégas, 2013):

$$P = \frac{\acute{P} + Sp - 1}{Se + Sp - 1}$$

$\boldsymbol{\acute{P}}$**:** Prevalencia aparente
Se: Sensibilidad
Sp: Especificidad

3.4.2.3 Chi Cuadrado x^2

Tabla No 5. Resultados generales del estudio.

Presencia de anticuerpos	Lugar de estudio	
	Hospital "Mascotas"	Clínica "Perros & Gatos"
Positivos	**5**	**1**
Negativos	**70**	**24**
Total	**75**	**25**

Se realizó el cálculo de la variable del lugar de estudio en donde se encuentran distribuidos el grupo A y grupo B, haciendo uso de la siguiente fórmula, (Cornejo Prado, 2004, pp. 1-18):

$$x^2 = \sum_{i=1}^{n} \left[\frac{(Oi - Ei)^2}{Ei} \right]$$

Se calcula de igual manera los grados de libertad (gl) en función de número de categorías (K), según Cornejo Prado (2004, pp. 1-18): **gl** = K – 1

Los valores de grados de libertad se ven en la siguiente tabla, para verificar si hay diferencia significativa o no significativa:

Tabla No 6. Distribución de chi cuadrado x^2

Grados de libertad	Probabilidad										
	0,95	0,90	0,80	0,70	0,50	0,30	0,20	0,10	0,05	0,01	0,001
1	0,004	0,02	0,06	0,15	0,46	1,07	1,64	2,71	3,84	6,64	10,83
2	0,10	0,21	0,45	0,71	1,39	2,41	3,22	4,60	5,99	9,21	13,82
3	0,35	0,58	1,01	1,42	2,37	3,66	4,64	6,25	7,82	11,34	16,27
4	0,71	1,06	1,65	2,20	3,36	4,88	5,99	7,78	9,49	13,28	18,47
5	1,14	1,61	2,34	3,00	4,35	6,06	7,29	9,24	11,07	15,09	20,52
6	1,63	2,20	3,07	3,83	5,35	7,23	8,56	10,64	12,59	16,81	22,46
7	2,17	2,83	3,82	4,67	6,35	8,38	9,80	12,02	14,07	18,48	24,32
8	2,73	3,49	4,59	5.53	7,34	9,52	11,03	13,36	15,51	20,09	26,12
9	3,32	4,17	5,38	6,39	8,34	10,66	12,24	14,68	16,92	21,67	27,88
10	3,94	4,86	6,18	7,27	9,34	11,78	13,44	15,99	18,31	23,21	29,59
	No significativo								Significativo		

Tomado de: (Cornejo Prado, 2004, p. 24).

3.4.2.4 Valor Predictivo

Se debe tomar en cuenta que los valores predictivos de un test no dependen solamente de la sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica, sino también de la prevalencia de la enfermedad, los cálculos se analizan haciendo uso de las siguientes fórmulas, según Pita y Pertégas (2013):

$$VP^{+} = \frac{p \times Se}{p \times Se + (1-p) \times (1-Sp)}$$

$$VP^{-} = \frac{(1-p) \times Sp}{p \times (1-Se) + (1-p) \times Sp}$$

p: Prevalencia

Se: Sensibilidad

Sp: Especificidad

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero que se realiza en la especie canina en el Distrito Metropolitano de Quito. Este estudio fue enfocado a identificar la presencia de Neospora caninum, para lo cual se analizó un total de 100 muestras de suero sanguíneo canino, repartidas en dos establecimientos veterinarios: Hospital Veterinario “Mascotas” y Clínica Veterinaria “Perros & Gatos”.

Los establecimientos veterinarios que fueron identificados para el muestreo se encuentran ubicadas en sectores muy poblados, en donde acuden al mes un promedio de 220 pacientes en el Hospital Veterinario “Mascotas” y 250 pacientes en la Clínica “Perros & Gatos”.

4.1 Resultados de los cálculos estadísticos descriptivos de Neospora caninum según las variables seleccionadas.

Tabla No 7. Resultados de los cálculos estadísticos descriptivos.

	Estadística descriptiva			
Variables	**Moda**	**Mediana**	**Promedio**	**Desviación Estándar**
Edad	2.8	4.94	4.78	2.81
Raza	12 – 19	-	-	-

Al realizar el análisis estadístico de las medidas de tendencias central analizando la variable edad:

La moda, nos arrojó el siguiente resultado: **Mo**= 2.8; tal resultado indica que la mayor frecuencia observada fue entre 2 a 3 años.

En cuanto a la media nos arrojó el siguiente resultado: $\tilde{x}$= 4.78; tal resultado indica que la media se encuentra entre los 4 y 5 años.

Con respecto a la mediana, nos arrojó el siguiente resultado: **Me**= 4.94; tal resultado indica que la mediana se encuentra entre los 4 y 5 años.

Y por último la desviación estándar, nos arrojó el siguiente resultado: **S**= 2.81; tal resultado indica que la desviación estándar se encuentra entre los 2 y 3 años.

Al realizar el análisis estadístico de la medida de tendencia central llamada moda I analizando la variable raza:

Nos arrojó el siguiente resultado **Mo=** 12 - 19, tal resultado indica que la mayor frecuencia observada fue entre las razas Labrador y Mestizo, en donde se puede observar muy claramente en la figura No 11.

4.2 Distribución de los resultados generales del análisis de laboratorio

Todas las muestras (n=100) fueron analizadas en el Laboratorio Livexlab, ubicado en sector el Inca, desde el mes de Noviembre 2012 hasta el mes de Enero 2013.

En la figura 8, se muestra la distribución de los resultados generales entre el grupo A (n=75) y el grupo B (n=25), encontrándose una prevalencia aparente a Neospora caninum del 6% y una prevalencia real del 1.53%. En donde la prevalencia aparente calculada es muy baja en comparación con un estudio realizado en Perú por del Campo et al., (2003), en un total de 104 muestras, 34 fueron seropositivos representando el 32.7%, teniendo en cuenta que las muestras analizadas fueron de caninos que viven en establos lecheros.

A comparación con el estudio realizado en Chile por Flores Yanez (2006, pp. 6-16), en donde la seroprevalencia es relativamente alta a comparación con este estudio, ya que del total de 110 perros, 39 (35,5%) resultó seropositivo a Neospora caninum. Dentro de los positivos 8 (13,3%) eran de consultorio; 21 (6,8%) provenían del refugio y 10 (62,5%) de lechería, tomando en cuenta que el presente estudio que se realizó en Quito, la procedencia de los animales en su gran mayoría era del Distrito Metropolitano (n=95), se asume que posiblemente por ser de una zona urbana la prevalencia de la enfermedad fue mínima a comparación con los resultados encontrados en los estudios anteriormente expresados.

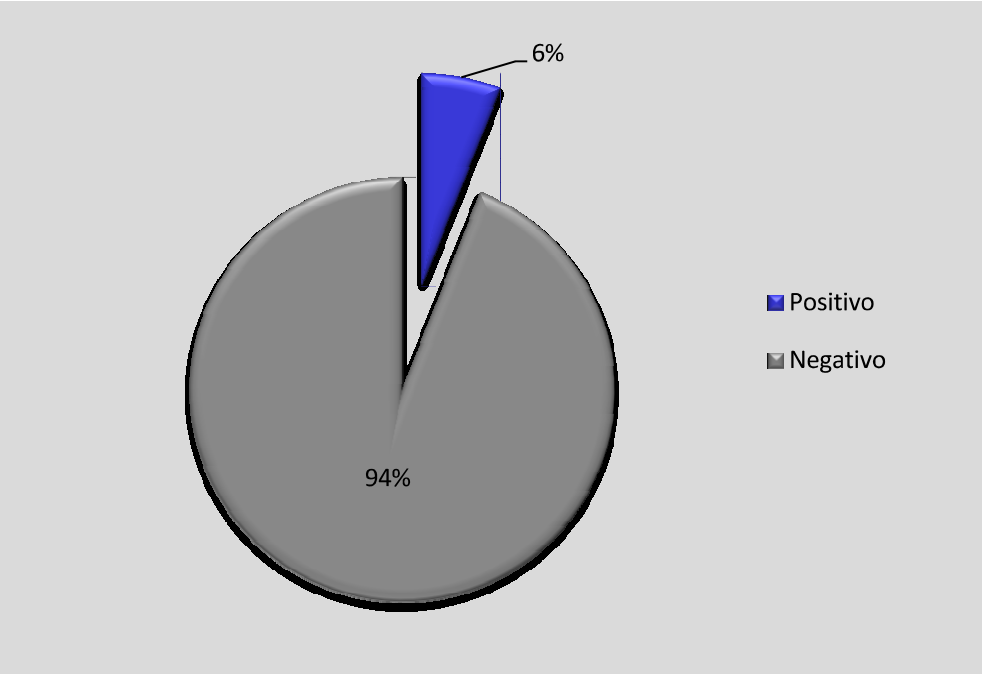


Figura No 8. Resultados del diagnóstico de Neospora en 100 caninos a través del uso de la técnica de IFI.

Todas las muestras positivas y negativas resultantes, fueron confirmadas repitiendo el Kit de Neospora (VMRD Neospora caninum (NC-1) IFA sustrate slide, Código: P120412-001) a una dilución 1/80, finalmente se obtuvieron 6 positivos, los cuales fueron tomados como diagnóstico definitivo.

4.3 Seroprevalencia de Neospora caninum según el lugar de estudio

Según el análisis de los resultados, indica que el grupo A: Hospital Veterinario "Mascotas" posee una prevalencia de la enfermedad de 6.66%, el cual es mayor en relación al grupo B: Clínica Veterinaria "Perros & Gatos" que posee una prevalencia del 4%, hecho que atribuye a que en el grupo A hay más animales muestreados que en el grupo B (ver tabla No 8).

Tabla No 8. Seroprevalencia de Neospora caninum según el lugar de estudio.

Grupo	N	Positivos	Porcentaje (%)	IC 95%
A	75	5	6.66	(1.5 - 10.50)
B	25	1	4	(1.2 – 12.00)
Total	100	6	6	(0 - 11.60)

Según los grupos, en el análisis de los resultados, indica que en el grupo A: Hospital Veterinario "Mascotas", los 5 seropositivos existentes representan el 6.66%, con respecto al grupo B: Clínica Veterinaria "Perros & Gatos" el único seropositivo existente representa el 4% (ver figura No 9).

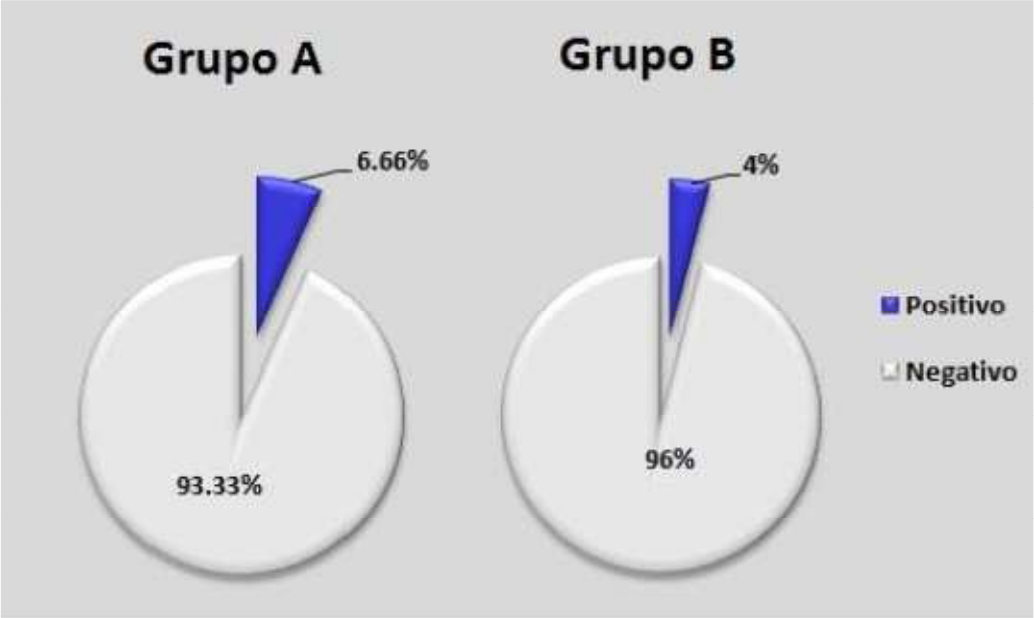


Figura No 9. Distribución de la seroprevalencia de Neospora caninum según el Grupo A y Grupo B

Los 5 seropositivos pertenecientes al grupo A, su procedencia es de la ciudad de Quito; dos viven en el campo; uno de ellos toma continuamente glucocorticoides; dos conviven con perros y vacas, uno convive con un gato; dos se alimentan diariamente de balanceado y restos de carne bovina cocida.

El único seropositivo perteneciente al grupo B, su procedencia es de la ciudad de Quito, visita de vez en cuando el campo, ha presentado signos de ataxia y se alimenta diariamente de balanceado y restos de carne bovina cocida.

Como se puede observar ciertas características de los animales seropositivos presentan similitud con las variables tomadas para ser analizadas en el presente estudio, esto nos ayuda a confirmar que verdaderamente presentan la enfermedad.

4.4 Seroprevalencia de Neospora caninum según la procedencia

Según el análisis de los resultados, la procedencia de los animales muestreados se distribuye de la siguiente manera: Quito; otra ciudad y otro país.

En donde nos indica que los 6 seropositivos existentes nacidos en Quito representan el 6.31%, mientras que en las categorías: otra ciudad y otro país, no hay ningún canino seropositivo (ver tabla No 9).

Tabla No 9. Seroprevalencia de Neospora caninum según la procedencia.

Procedencia	N	Positivos	Porcentaje (%)
Quito	**95**	**6**	**6.31**
otra ciudad	**2**	**-**	**-**
otro País	**3**	**-**	**-**
Total	**100**	**6**	**6**

Esto quiere decir que según los resultados analizados en la ciudad de Quito la prevalencia de la enfermedad representa un gran porcentaje 6.31%, en comparación a los animales muestreados nacidos en otras ciudades y otros países ya que no presentaron anticuerpos de Neospora caninum.

4.5 Seroprevalencia de Neospora caninum según el entorno

Según el análisis de los resultados de acuerdo al entorno de los animales muestreados, se distribuyen de la siguiente manera: ciudad y campo (ver tabla No 10).

Tabla No 10. Seroprevalencia de Neospora caninum según el entorno.

Ambiente	N	Positivos	Porcentaje %
Ciudad	**88**	**4**	**4.54**
Campo	**12**	**2**	**16.66**
Total	**100**	**6**	**6**

En donde 4 seropositivos que viven en la ciudad representan el 4.54%, todos nacieron en la ciudad de Quito; uno de ellos visita una finca todos los fines de semana; y 2 seropositivos que viven en el campo representan el 16.66%.

Comparando los resultados con el estudio realizado en México por Gamón (2010, pp. 2-19), del total de 57 perros, 27 provenían de 9 establos y los 30 restantes provenían del Distrito Federal, del total 14 seropositivos que vivían en los establos representan 51.85% con respecto a los 6 seropositivos que vivían en la ciudad representan el 20%.

Como se puede observar comparando con los resultados que se obtuvieron en el estudio realizado en México tenemos una relación casi aproximada en cuanto al número de animales seropositivos que viven en la ciudad, pero en cuanto a los animales que viven en el campo en México la cantidad de

animales seropositivos es mucho más alta que el encontrado en el presente estudio.

4.6 Seroprevalencia de Neospora caninum según la edad

Según el análisis de los resultados de acuerdo a la edad de los animales muestreados se distribuyen de la siguiente manera: ≤ 3 años; 4 - 7 años; ≥ 8 años.

En donde 1 seropositivo que se encuentra en el rango de edad menor o igual a tres años (≤ 3) representa el 2.63%; 2 seropositivos que se encentran en el rango de edad de cuatro a siete años (4–7) representan el 5% y 3 seropositivos que se encuentran en el rango de edad mayor o igual a 8 años (≥ 8) representan 13.63% (ver tabla No 11).

Tabla No 11. Seroprevalencia de Neospora caninum según la edad.

Rango de Edad	n	Positivos	Porcentaje %
≤ 3 años	**38**	**1**	**2.63**
4 - 7 años	**40**	**2**	**5**
≥ 8 años	**22**	**3**	**13.63**
Total	**100**	**6**	**6**

Según los resultados los animales de la categoría ≤ 3 y de 4-7 años son los que menos seropositivos presentan, mientras que los animales gerontes (≥ a 8) son la mayoría de seropositivos, a comparación con el estudio realizado en Perú por Cornejo Prado (2004, pp. 1-18), nos muestra los mismos resultados con respecto a la edad, los animales menores a un año presentaron una prevalencia del 5.8%, que va incrementando al igual que la edad de los animales, la prevalencia más alta fue en animales con siete años o más (37.5%).

M. Valderrama (Comunicación personal, 15° de enero, 2013) opina que los animales gerontes son más susceptibles a la enfermedad puesto a que su

inmunidad suele bajar a esas edades (Gerosa, 2007, pp. 12-38; Mucha, Sorribas y Pellegrino 2005, pp. 468-472).

En cuanto al seropositivo de la categoría ≤ 3 toma continuamente glucocorticoides puesto a que tiene problemas de piel, se cree que se trata de un caso de transmisión transplacentaria.

Los dos seropositivos de la categoría 4-7 años una estaba preñada en donde se asume que cursa un cuadro de estrés total y mantiene contacto con bovinos; y la otra seropositiva concurre el campo, mantiene contacto con bovinos y presenta signos de ataxia.

En cuanto a los últimos tres seropositivos uno vive en el campo y convive con bovinos; a otro seropositivo se le diagnosticó un problema degenerativo articular en la vértebra Lumbar (L5) el cual le generaba mucho dolor en donde causarle un cuadro de estrés y la descarga de glucocorticoides endógenos; y el último aparentemente curso un cuadro de estrés por la llegada de dos nuevas mascotas.

Todos los seropositivos cursaron cuadros de estrés, lo cual posiblemente los hizo mucho más susceptibles a contraer la enfermedad.

4.7 Seroprevalencia de Neospora caninum según el género

Según el análisis de los resultados de acuerdo al género de los animales muestreados se distribuyen entre: hembras y machos.

En donde nos indica que los 6 seropositivos existentes se distribuyen de la siguiente manera: 4 seropositivos hembras representa el 7.84% y los 2 seropositivos machos representan el 4.08% (ver figura No 10).

De los resultados que se obtuvieron en el presente estudio al compararlos con los estudios realizados en Perú por Cornejo Prado (2004, pp. 1-18), muestra

que los perros machos presentaron una prevalencia del 25.7%, mayor a la encontrada en las hembras 11.11%. En cuanto al estudio realizado en Chile por Flores Yánez (2006, pp. 6-16), del total de 59 machos 17 fueron positivos representando el 28,8% y del total de 51 hembras 22 fueron positivas representando el 43,1%, lo que demuestra que la enfermedad no tiene predisposición por género, esto se debe a que no se encontró diferencias significativas entre sexos.

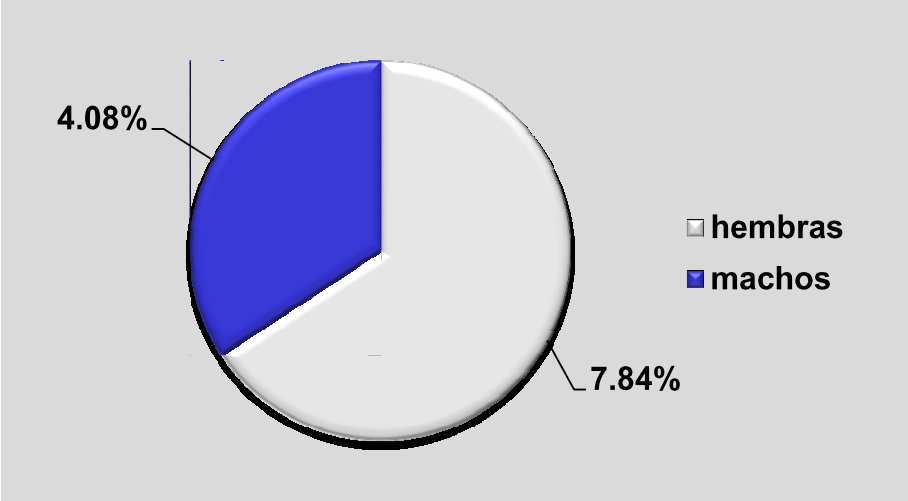


Figura No 10. Distribución total de los resultados de Neospora caninum según el género

Las cuatro seropositivas son hembras, una de ellas vive en el campo, tiene contacto con bovinos y está preñada; otra seropositiva concurre el campo y tiene contacto con bovinos; otra seropositiva toma continuamente glucocorticoides y la última seropositiva es una perrita geronte.

Los dos seropositivos restantes son machos, uno vive en el campo y tiene contacto con bovinos y el otro seropositivo es un perro geronte que sufre de un problema degenerativo articular.

4.8 Seroprevalencia de Neospora caninum según la raza

En el gráfico 4.4 se muestra la distribución total de todos los animales muestreados según su raza.

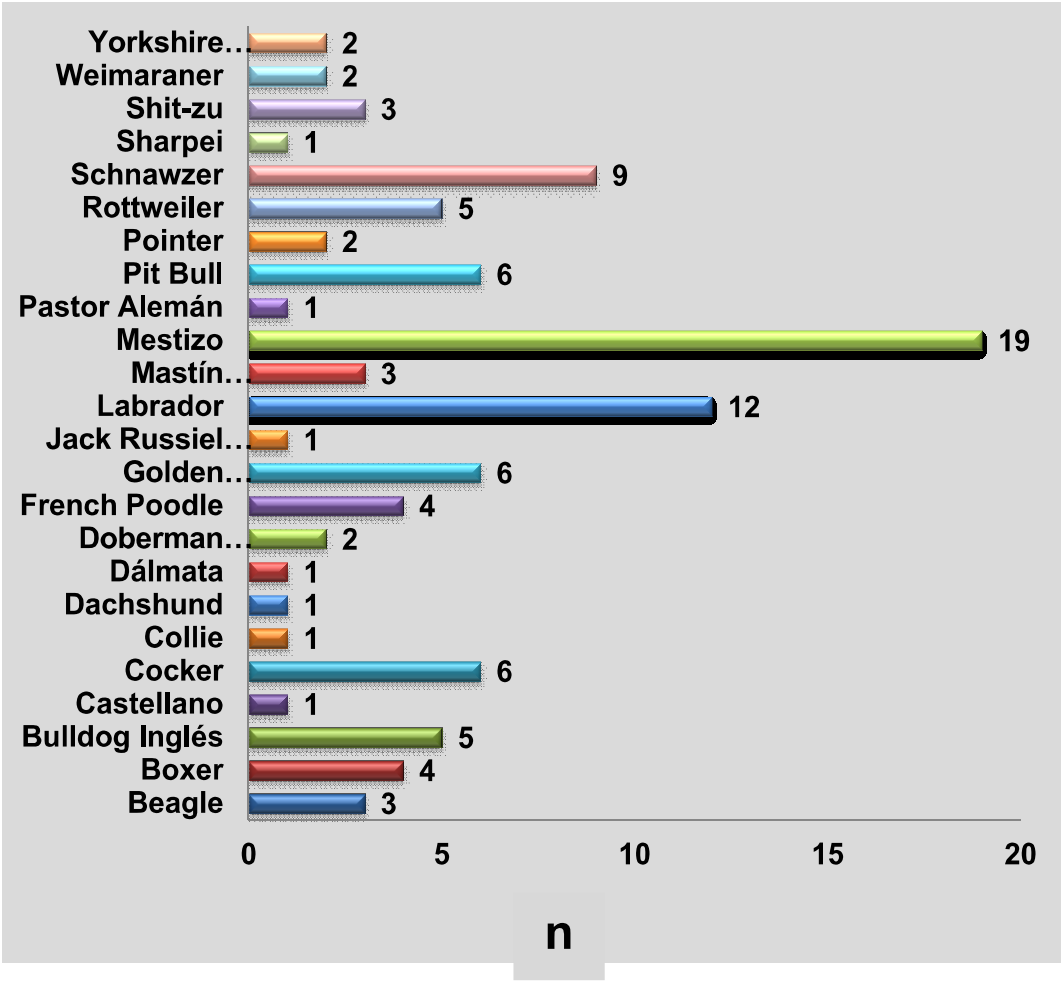


Figura No 11. Distribución total muestral de Neospora caninum según las razas.

Según el análisis de los resultados de acuerdo al tamaño de los animales muestreados, se distribuyen de la siguiente manera: miniatura (≤ 6kg); pequeña (7 - 10Kg); mediana (11 - 25kg); grande (26 - 45kg) y gigante (≥ 46kg).

Según Rossi (2002, pp. 43-204), las razas que pertenecen a la categoría mediana son: Beagle (n=3); Bulldog (n=5); Cocker (n=6); Dálmata (n=1); Pitbull (n=6) y Shar-pei (n=1).

Y las razas que pertenecen a la categoría grande son: Bóxer (n=4); Collie (n=1); Golden retriever (n=6); Labrador (n=12); Pastor Alemán (n=1); Pointer (n=2); Rottweiler (n=5) y Weimaraner (n=2).

Tabla No 12. Distribución de las razas según el tamaño.

Miniatura	Pequeña	Mediana	Grande	Gigante	Otras
Doberman Pincher	Castellano	Beagle	Bóxer	Mastín Napolitano	Mestizo
	Dachshund	Bulldog	Collie		
	French Poodle	Cocker	Golden Retriever		
	Jack Russell	Dálmata	Labrador		
	Schnawzer	Pitbull	Pastor Alemán		
	Shihtzu	Shar-pei	Pointer		
	Yorkshire Terrier		Rottweiler		
			Weimaraner		
2	**21**	**22**	**33**	**3**	**19**

En donde 2 seropositivos de raza mediana representan el 9.09% y 4 de los seropositivos de raza grande representan el 12.12% (ver tabla No 13).

Tabla No 13. Seroprevalencia de Neospora caninum de razas según el tamaño.

Categorización por Tamaño	N	Positivo	Porcentaje %
miniatura (≤ 6kg)	**2**	**-**	**-**
pequeña (7 - 10Kg)	**21**	**-**	**-**
mediana (11 - 25kg)	**22**	**2**	**9.09**
grande (26 - 45kg)	**33**	**4**	**12.12**
gigante (≥ 46kg)	**3**	**-**	**-**
Otros	**19**	**-**	**-**
Total	**100**	**6**	**6**

En donde cuatro de los seropositivos de raza grande son: dos hembras de raza Bóxer; una de ellas toma continuamente glucocorticoides y vive en la cuidad; otra seropositiva concurre el campo y tiene contacto con bovinos; dos seropositivos son de raza Labrador, uno es macho y la otra es hembra, los dos viven en el campo y conviven con bovinos, la hembra está preñada y el macho es geronte.

Y los dos últimos seropositivos de raza mediana son: de raza Pitbull, uno es macho y la otra es hembra, viven en la ciudad, son animales gerontes, el macho presenta degeneración articular y los dos cursaron cuadros recientes de estrés.

Según el análisis de los resultados de acuerdo a la utilidad de los animales muestreados, se distribuyen de la siguiente manera: caza; compañía; defensa; guardia; ovejero; y otras.

Según Rossi (2002, pp. 43-204), las razas que se incluyeron en la categoría caza fueron: Beagle (n=3); Cocker (n=6); Dachshund (n=1); Golden retriever (n=6); Labrador (n=12); Pointer (n=2) y Weimaraner (n=2). En la categoría defensa se incluyeron las razas: Bóxer (n=4); Bulldog inglés(n=5) y Rottweiler (n=5), y por último en la categoría guardia se incluyeron las razas: Dálmata (n=1); Jack russell (n=1); Mastín napolitano (n=3); Pastor alemán (n=1) y Pitbull (n=6).

Tabla No 14. Distribución de las razas según la utilidad.

Compañía	Defensa	Caza	Ovejero	Guarda	Otras
Shihtzu	Bóxer	Beagle	Collie	Pastor Alemán	Mestizo
Yorkshire Terrier	Bulldog	Golden Retriever		Mastín Napolitano	
Shar-pei	Rottweiler	Labrador		Dálmata	
Doberman Pincher		Pointer		Jack Russell	
Schnawzer		Cocker		Pitbull	
French Poodle		Dachshund			
Castellano		Weimaraner			
22	**14**	**32**	**1**	**12**	**19**

En donde dos seropositivos de utilidad para la caza representan el 6.25%, otros dos seropositivos de utilidad para defensa representan el 14.28% y los últimos dos seropositivos de utilidad para guardia representan el 16.66% (ver tabla No 15).

Tabla No 15. Seroprevalencia de Neospora caninum de razas según la utilidad.

Razas por Utilidad	N	Positivos	Porcentaje %
Caza	**32**	**2**	**6.25**
Compañía	**22**	**-**	**-**
Defensa	**14**	**2**	**14.28**
Guardia	**12**	**2**	**16.66**
Ovejero	**1**	**-**	**-**
Otras	**19**	**-**	**-**
Total	**100**	**6**	**6**

Según los resultados anteriormente expresados, los animales seropositivos son provienen de las categorías: caza (n=2); defensa (n=2) y guardia (n=2).

En donde los seis seropositivos son : dos de raza Labrador, uno es macho, convive con bovinos y es geronte, la otra es hembra, convive con bovinos y está preñada; dos seropositivos son de raza Bóxer, las dos son hembras, la una toma continuamente glucocorticoides; y la otra concurre el campo, tiene contacto con bovinos y tiene problemas de ataxia; y por último los dos seropositivos son de raza Pitbull, el uno es macho el cual es un perro geronte y se le diagnosticó un problema de degeneración articular, la otra es hembra geronte y curso un cuadro de estrés por la llegada de nuevas mascotas.

Pues la hipótesis se basa en que los propietarios de estas mascotas poseen haciendas y hogares en el campo o la ciudad, en donde los propietarios seleccionan a estos animales por su aptitud para resguardar las propiedades, por lo tanto los animales de estas categorías por su utilidad fueron todos los seropositivos que se encontraron, comparando con el resto de categorías su aptitud no es apta para el resguardo de las propiedades anteriormente mencionadas.

No se compara con otros estudios realizados ya que en su mayoría no toman en cuenta a esta variable.

4.9 Seroprevalencia de Neospora caninum según signos neurológicos

Según el análisis de los resultados de acuerdo a los signos neurológicos presentes en los animales muestreados, se distribuye de la siguiente manera: ataxia; mialgia (Músculos lumbares); neuritis; paresia bilateral + hiperextención + mialgia; Ninguno.

En donde el único seropositivo presentó ataxia el cual representa el 33.33% (ver tabla No 16).

Tabla No 16. Seroprevalencia de Neospora caninum según signos neurológicos.

Signos Neurológicos	N	Positivos	Porcentaje %
Ataxia	**3**	**1**	**33.33**
Mialgia - Músculos Lumbares	**1**	**-**	**-**
Neuritis	**1**	**-**	**-**
Paresia bilateral + Hiperextención + Mialgia	**2**	**-**	**-**
Ninguno	**93**	**-**	**-**
Total	**100**	**1**	**1**

Según el estudio realizado en Chile por Flores Yánez (2006, pp. 6-16), los signos más comúnmente registrados en los animales seropositivos pertenecientes a consultorios fueron: dolor al caminar (37,7%), convulsiones (25%), ataxia e hiperestesia (12,5%), en los negativos fueron cojera (34,6%), dolor al caminar (21,1%) e incontinencia y convulsiones (19,2%).

Por otro lado, en el estudio que se realizó en Perú por Ruiz Ríos (2009, pp. 26-45) los caninos con signos de afección neuromuscular representan el 5.21%, tal resultado es similar a las obtenidas en otros estudios por Mineo y otros (2001, pp. 239-245), el cual representa el 6.7%, por Varandas y otros (2001, 105-111) el 6.9% y por Cheadle, Spencer y Blagbum (1999, pp. 248-251) el 7%.

Sin embargo, la seroprevalencia encontrada en el presente estudio es relativamente menor, ya que del total de las muestras obtenidas n=100, uno presentó signología compatible con la enfermedad, el cual representa el 1%, el signo neural que se registró es ataxia, al presentar este problema sugiere hay un daño de la neurona motora superior e inferior (Morales y Montoliu, 2012, pp. 1-15).

La hipótesis según lo encontrado es que los cinco seropositivos se los consideraría como portadores sanos ya que no presentaron signología neural compatible a Neospora caninum, esto puede deberse a que la enfermedad se encuentra de manera latente en estos individuos y podría reactivase en algún momento.

4.10 Seroprevalencia de Neospora caninum según el tipo de alimentación

Según el análisis de los resultados de acuerdo al tipo de alimentación de los animales muestreados, se distribuyen de la siguiente manera: crudo; semicocido; cocido; balanceado (ver tabla No 17).

Tabla No 17. Seroprevalencia de Neospora caninum según el tipo de alimentación.

Tipo de Alimentación	N	Positivos	Porcentaje %
Crudo	**6**	**-**	**-**
Semicocido	**4**	**-**	**-**
Cocido	**31**	**3**	**9.67**
Balanceado	**59**	**3**	**5.08**
Total	**100**	**6**	**6**

En donde 3 seropositivos que consumen alimento cocido representan el 9.67% y 3 seropositivos que consumen alimento balanceado representan el 5.08%.

Al comparar los resultados con el estudio realizado en Chile por Patitucci y otros (2001, pp. 227-232), el número de animales con presencia de anticuerpos categorizados de acuerdo al tipo de alimento que recibían, los animales que consumen "carne cruda" fueron positivos el 29,5% (21/71) de los animales que consumen "no cruda" fueron positivos el 7% (9/65), estos animales tuvieron mayor riesgo comparados con los animales que se alimentan a base de concentrados y comida de casa.

Pero comparándolo con el presente estudio, de los 6 animales seropositivos, tres se alimentan diariamente de comida cocida y los tres restantes con alimento balanceado; los resultados de esta variable son relativamente bajos, por lo tanto se genera la hipótesis que al encontrar una prevalencia relativamente baja y que ningún animal seropositivo consume diariamente alimento crudo ó semicocido, este medio de contagio no es representativo comparado con otros países, tomando en cuenta que el presente estudio se realizó en una zona urbana.

4.11 Seroprevalencia de Neospora caninum según uso de glucocorticoides

Según el análisis de los resultados de acuerdo al uso de glucocorticoides en los animales muestreados, en donde el único seropositivo registrado representa el 8.33% (ver tabla No 18).

Tabla No 18. Seroprevalencia de Neospora caninum según uso de glucocorticoides.

Uso Glucocorticoides	N	Positivos	Porcentaje %
Sí	12	1	8.33
No	88	5	6.82
Total	100	6	6

Según los resultados que se encontraron en el presente estudio concuerdan con un estudio realizado en Chile por Flores Yánez (2006, pp. 6-16), en donde los animales seropositivos que presentaron signología compatible, uno fue tratado anteriormente con glucocorticoides, el cual representa el 12,5%.

Según el presente estudio se arrojó la siguiente hipótesis, al momento de tratar con glucocorticoides por periodos de tiempo prolongados, puede causar inmunosupresión, por tal razón hay una baja de defensas que los hace susceptibles a cualquier enfermedad que puede presentarse de manera aguda (Plumb y Pharm, 2006, pp. 375-377), pero según la prevalencia encontrada en el presente estudio, es muy raro encontrar este tipo de casos ya que de todos los animales seropositivos encontrados solo uno utilizó glucocorticoides.

Se debe tomar en cuenta las características de los otros animales seropositivos ya que no sólo las administración de glucocorticoides es el único factor que puede inmunosuprimir; otro factor que es importante considerar es el estrés ya que por esta razón hay la liberación de glucocorticoides endógenos (Álvarez, 2007, pp. 11-14).

En cuanto a los seropositivos que no toman continuamente glucocorticoides pero si cursaron un cuadro de estrés reciente son:

Un seropositivo de raza labrador, estaba preñada y convive con bovinos; otra seropositiva es de raza Bóxer, concurre el campo y presenta signos de ataxia.

Otro seropositivo es de raza Labrador, macho, vive en el campo y convive con bovinos, es una animal geronte; otro seropositivo es de raza Pitbull, macho geronte, se le diagnosticó un problema degenerativo articular en la vértebra Lumbar (L5) el cual le producía mucho dolor por tal razón curso un cuadro de estrés y se debe tomar en cuenta que la causa de esa degeneración desencadenó la descarga de glucocorticoides endógenos que pudo causar inmunosupresión; y el último seropositivo es de raza Pitbull, hembra geronte

que aparentemente curso un cuadro de estrés por la llegada de dos nuevas mascotas.

Todos los seropositivos cursaron cuadros de estrés lo cual posiblemente pudo generar una ligera descarga de glucocorticoides endógenos, que hizo que estos animales sean mucho más susceptibles a contraer Neospora Caninum.

4.12 Seroprevalencia Neospora caninum según la convivencia con animales domésticos

Según el análisis de los resultados de acuerdo a la convivencia de animales domésticos con los animales muestreados, se distribuyen de la siguiente manera:

caballo(s), cabra(s), cerdo(s) y oveja(s); gato(s); perro(s); vaca(s); perro(s) y vaca(s); y ninguno.

En donde 1 seropositivo que convive con un gato representa el 33.33%; 2 seropositivos que conviven con perros representan el 2.98%, 2 seropositivos que conviven con perros y vacas representan el 20% y 1 seropositivo que no convive con ningún animal doméstico representa el 5.26% (ver tabla No 19)

Tabla No 19. Seroprevalencia de Neospora caninum según la convivencia con animales domésticos.

Convivencia con animales domésticos	N	Positivos	Porcentaje %
Caballo(s), Cabra(s), Cerdo(s) y Oveja(s)	-	-	-
Gato(s)	3	1	33.33
Perro(s)	67	2	2.98
Vaca(s)	1	-	-
Perro(s) y Vaca(s)	10	2	20
Ninguno	19	1	5.26
Total	100	6	6

Pues según los resultados, la mayoría de los animales muestreados al ser provenientes de una zona urbana, el contacto con bovinos es muy escaso y como se puede observar es muy baja la prevalencia encontrada de los animales que están en contacto con tal especie en la ciudad de Quito, por esta razón se puede decir que el contagio a nivel horizontal (de perros y animales domésticos) es difícil, pero si podemos suponer que según los resultados el contagio en la ciudad puede ser más de tipo vertical (de madre a hijo).

Se debe tomar en cuenta que uno de los seropositivo encontrados, convive con un gato, esto nos haría sospechar de una reacción cruzada con T. gondii, pero al momento de analizar las muestras en el laboratorio, se las observó con cautela, descartando las muestras en las que se observaba fluorescencia apical. En este caso se consideró positivas a las muestras que se tenían una fluorescencia completa de todo el contorno del taquizoíto, por tal razón se descarta completamente una reacción cruzada.

4.13 Seroprevalencia de Neospora caninum según la presencia de abortos

Según el análisis de los resultados de acuerdo a la presencia de abortos en los animales muestreados, en donde los 6 seropositivos encontrados no presentaron signos de aborto, ni tuvieron contacto con material abortado. No se pudo comparar con otros estudios por tal razón esta variable no es relevante para el estudio.

4.14 Determinación de la prevalencia

Al realizar el análisis estadístico inferencial: el resultado de la prevalencia fue **p**= 6; tal resultado indica que hay la presencia de la enfermedad en un 6% en total de toda la población muestreada.

4.15 Determinación de la prevalencia real

Al realizar el análisis estadístico inferencial, se calculó la prevalencia real, encontrándose un 1.53%, este resultado indica que se ajusta la estimación de la enfermedad tomando en cuenta la sensibilidad y especificidad del método utilizado, en este caso de IFI, la información utilizada para este cálculo fue **Se**= 0.98 y **Sp**= 0.97. La variación entre la prevalencia aparente y la prevalencia real es que la primera no considera que el método no sea 100% perfecto.

4.16 Determinación del Chi Cuadrado x^2

Al realizar el análisis del Chi cuadrado, se probó que existe diferencia altamente significativa entre las muestras observadas y esperadas entre el Grupo A (5/75) y el Grupo B (1/25), el resultado del análisis fue ($\boldsymbol{x^2}$= 16.27), el cual nos indica que para que exista tal diferencia pudo deberse a el sitio en donde se recogió las muestras (flujo de pacientes por establecimiento); la procedencia de los animales (no todos son del mismo lugar) o tal vez solo el hecho que se han analizado más muestras (grupo A n=75 y grupo B n=25).

4.17 Determinación del Valor predictivo

Al realizar el análisis del valor predictivo, nos arrojó los siguientes resultados: **VP^+**= 0.54 y **VP^-**= 0.99. Esto nos indica que la prueba IFI posee un valor predictivo positivo del 54%, es decir que la mitad de los animales seropositivos están infectados (verdaderos positivos), en este caso 6 de los seropositivos 3 son verdaderos; y un valor predictivo negativo del 99%, en donde nos indica que casi todos los animales seronegativos estén realmente sanos (verdaderos negativos).

Según Ruiz Ríos (2009, pp. 26-45), la prueba IFI tiene una sensibilidad de 98% y una especificidad de 97%., en el presente estudio se demostró que la prueba aporto con una sensibilidad 0.54% y una especificidad del 99%, en donde el

porcentaje de la sensibilidad es baja y la especificidad es alta a comparación con la que señala Ruiz Ríos (2009, pp. 26-45).

4.18 Casos clínicos

4.18.1 Caso Clínico # 1

Nombre: Shayna
Raza: Bóxer
Edad: 4 años
Sexo: Hembra
Propietaria: Rosa Vera

Este paciente nació el 21 de Marzo del 2009, perteneció a una camada de 8 cachorros, en donde todos los cachorros murieron aparentemente por parvovirosis, su madre presentó dermatitis nodular antes y durante la gestación, posteriormente al parto mejoró considerablemente pero su total recuperación fue a través de la administración de un anticoccidiósico de amplio espectro llamado Toltrazuril (Toltrazol), actualmente está sana y volvió a preñarse, nacieron 6 cachorros completamente sanos.

Se tomó en cuenta la historia clínica de Shayna ya que se considera como una caso de transmisión transplacentaria, ya que la madre presentó una dermatitis nodular signo importante a considerar en Neosporosis canina, Shayna también presenta esta dermatitis nodular la cual se desencadenó por una vacuna de virus vivo que se cree reactivó la enfermedad (Greene, 2008, pp. 843-850).

Tabla No 20. Historia clínica de un paciente seropositivo a Neospora caninum.

Datos del Paciente					
Caso:	N-1648-38	**Nombre:**	Shayna		
Especie:	Canino	**Raza:**	Bóxer		
Edad:	3 años	**Sexo:**	Hembra		
Edad	**Antecedentes**	**Signología**	**Diagnóstico**	**Tratamiento**	**Estado**
7 sem	vacuna Parvo-corona	-	-	-	normal
7 sem	baño 2 días post-vacuna	Pústulas y prurito	Alergia	Penicilina	mejoró
11 sem	vacuna séxtuple	-	-	-	normal
14 sem	vacuna séxtuple	alopecia, pústulas y prurito	Alergia	corticoides y bloqueador	empeoró
37 sem	vacuna séxtuple y rabia	-	-	-	Normal
40 sem		esclerodermia	Hipotiroidismo	Levotiroxina	mejoró
60sem	-	prurito en oído medio y externo	otitis bilateral	ketoconazol y funhit	mejoró
64 sem	Pulgas	Prurito en la grupa	alergia a pulgas	dermil y fipronil	mejoró
112 sem	-	prurito en cuerpo y oídos	otitis y dermatomicosis	funhit, fluconazol, ivermectina, amitraz y prednisolona continua	empeoró
144 sem	-	Prurito en todo el cuerpo	dermatomicosis	ivermectina,amitraz y prednisolona continua	empeoró
168 sem	-	pústulas en belfos	Foliculitis	baytril y prednisolona continua	empeoró
180 sem	-		Neosporosis	Clindamicina, trimetoprim sulfametoxazol, omeprazol y proteliv	mejoró

Regresa a consulta en diciembre 2012 en donde se le hace conocer el presente estudio que se estaba realizando en ese tiempo, a ella se le considero muy importante por el problema que fue acarreando durante todo ese tiempo, se le informo sobre la enfermedad, la propietaria decide que Shayna participe,

en donde según los análisis de la muestra nos arrojó que es positiva a Neospora caninum, en este primer análisis se utilizó un punto de corte 1/50, se le comunica a la propietaria y ella permite que se realice el tratamiento.

Bajo la total supervisión del Propietario del Hospital Veterinario “Mascotas” el Dr. Patricio Jara, se le realizó un hemograma y química sanguínea (Anexo N°10), al ver que todo se encontraba dentro de los rangos normales se realizó el siguiente tratamiento inicial:

- Clindamicina de (300 mg) 250 mg bid, por 4 semanas
- Omeprazol de (20 mg) 17,5 mg sid, por 4 semanas
- Trimetoprim (160 mg) sulfametoxazol (800 mg) 375 mg bid, por 4 semanas
- Nicotinamida, Bitartrato de Colina, Metilbromuro de Homatropina, Dehidrocolato de sodio, desoxicolato de sodio – Hepatoprotector, colagogo y colerético (Proteliv) 20 gotas sid, por 4 semanas

Se suspendió completamente los corticoides desde el 26 de enero 2013, fecha en la que inició el tratamiento para Neospora caninum.

la primera semana se observó ausencia de prurito, sin problema alguno, de igual manera la segunda semana, en cuanto a la tercera semana inició el prurito por lo cual se generó nuevas lesiones, se sugirió administrar nuevamente corticoides el 17 de febrero 2013 por la presencia de prurito, en la última semana se observaron buenos resultados las lesiones cicatrizaron rápidamente hecho que nunca sucedió anteriormente y su piel comenzó a mejorar, el 25 de febrero 2013 se repitió la prueba serológica en donde se utilizó un punto de corte 1/80 el resultado fue positivo nuevamente, pero con una carga menor a la que se encontró anteriormente, al ver que aplicamos el tiempo mínimo de tratamiento se sugirió aumentar por 2 semanas más, pero la propietaria se negó por situaciones económicas.

4.18.2 Caso Clínico # 2

Datos del Paciente			
Caso:	N-1648-20	**Nombre:**	Manch
Especie:	Canino	**Raza:**	Labrador
Edad:	8 años	**Sexo:**	Macho

Su procedencia es de la ciudad de Quito, vive en el campo desde cachorro, el cual al momento de tomar la muestra se encontraba aparentemente sano, no presentaba signología neural, no le administraban glucocorticoides, por la edad es un animal geronte, convive con 4 caninos de raza labrador todos machos, tiene contacto con vacas dos veces al día al momento del ordeño, y su tipo de alimentación es carne de bovino cocido más balanceado, se le comunicó a la propietaria sobre la seropositividad a Neospora caninum (Anexo N°10), pero lastimosamente por ser un animal geronte habría la posibilidad de generar efectos secundarios en hígado y riñón por la medicación, por tal razón no se le dio tratamiento medicamentoso.

4.18.3 Caso Clínico # 3

Datos del Paciente			
Caso:	N-1648-21	**Nombre:**	Bianca
Especie:	Canino	**Raza:**	Labrador
Edad:	7 años	**Sexo:**	Hembra

Su procedencia es de la ciudad de Quito, vive en el campo desde cachorra, al momento de tomar la muestra se encontraba preñada (hace un mes y medio) y presentaba dermatitis nodular en el lomo, no presentaba signología neural, no le administraban glucocorticoides, convive con 1 caninos de raza Pitbull macho, tiene contacto con vacas dos veces al día al momento del ordeño, y su tipo de alimentación es balanceado, se le comunicó al propietario sobre la seropositividad a Neospora caninum (Anexo N°10) pero por estar en periodo de gestación no podía recibir un tratamiento medicamentoso, semanas después parió todos los cachorros nacieron aparentemente sanos, se le sugirió que les

realiza un examen serológico a cada cachorro al mes y medio para descartar la transmisión transplacentaria.

4.18.4 Caso Clínico # 4

Datos del Paciente			
Caso:	N-1648-29	**Nombre:**	Pancho
Especie:	Canino	**Raza:**	Pitbull
Edad:	10 años	**Sexo:**	Macho

Su procedencia es de la ciudad de Quito, vive en el ciudad, al momento de tomar la muestra el propietario menciono que recientemente se le diagnosticó degeneración articular a nivel de las vértebras lumbares (L5), no le administraban glucocorticoides, convive con 1 gato macho y su tipo de alimentación es carne bovina cocida y balanceado, se le comunicó al propietario sobre la seropositividad a Neospora caninum (Anexo N°10), pero por ser un animal geronte habría la posibilidad de generar efectos secundarios en hígado y riñón por la medicación, por tal razón no se le dio tratamiento medicamentoso.

4.18.5 Caso Clínico # 5

Datos del Paciente			
Caso:	N-1648-25	**Nombre:**	Buba
Especie:	Canino	**Raza:**	Pitbull
Edad:	11 años	**Sexo:**	Hembra

Su procedencia es de la ciudad de Quito, vive en el ciudad, al momento de tomar la muestra la propietaria menciono la llegada reciente de dos nuevas mascotas lo cual sufrió un cuadro de estrés por tal cambio, no presento signología neural, no le administraban glucocorticoides, convive con 2 caninos macho y hembra y su tipo de alimentación es balanceado, se le comunicó al propietario sobre la seropositividad a Neospora caninum (Anexo N°10), pero por ser un animal geronte abría la posibilidad de generar efectos secundarios

en hígado y riñón por la medicación, por tal razón no se le dio tratamiento medicamentoso.

4.18.6 Caso Clínico # 6

Datos del Paciente			
Caso:	N-1648-B-16	**Nombre:**	Paquita
Especie:	Canino	**Raza:**	Bóxer
Edad:	6 años	**Sexo:**	Hembra

Su procedencia es de la ciudad de Quito, vive en el ciudad, concurre el campo a una finca, presentó signos de ataxia desde hace 15 días, no le administraban glucocorticoides, tiene contacto con bovinos y su tipo de alimentación es carne de bovino cocida y balanceado, se le comunicó al propietario sobre la seropositividad a Neospora caninum (Anexo N°10), pero por motivos económicos no se le dio tratamiento medicamentoso.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Con este estudio se demuestra la presencia de anticuerpos de Neospora caninum en el grupo estudiado, pacientes que acuden al Hospital veterinario "Mascotas" y la Clínica Veterinaria "Perros y Gatos" ubicados al norte del Distrito Metropolitano de Quito.

- Se identificaron casos de Neospora caninum en caninos aparentemente sanos, los cuales no presentaron signología neural compatible, provenientes en su mayoría de zona urbana y muy escasos de zona rural del Distrito Metropolitano.

- De 100 muestras caninas, se encontró 6 seropositivos los cuales representan una prevalencia del 6 %; todos nacieron en la ciudad de Quito, dos viven en el campo, uno concurre el campo, tres tienen contacto con bovinos, uno convive con un gato, con esto se concluye que no necesariamente Neospora caninum se encuentra en fincas, sino también en la cuidad por estos resultados ya que solo tres seropositivos han estado en las condiciones aptas para el contagio mientras que los otros tres no han estado en tales condiciones.

- La prueba de IFI mostro ser útil, confiable y segura para la detección de anticuerpos. Al momento de analizar las muestras, se consideró positivas a las que mostraban una fluorescencia completa de todo el taquizoíto y negativas a las que mostraban fluorescencia apical, lo cual indica que se descarta alguna reacción cruzada.

- Existe una correlación directa entre la edad (gerontes, inmunosupresión ligada a edad), y el resultado positivo a la prueba. Con respecto a las aptitudes de la raza al encontrar alta seropositividad en las categorías de caza y defensa, se podría decir que la necesidad de los propietarios de cuidar sus propiedades hace que se convierta en un factor de riesgo a considerar.

- La enfermedad no tiene predisposición por género, de igual manera el tipo de alimentación y abortos.

- La transmisión horizontal no fue demostrada en este estudio, ya que los animales seropositivos no conviven ni tienen contacto directo con bovinos, por tal razón podemos concluir que la forma de contagio más común de la enfermedad en la cuidad es de tipo vertical.

- Existe un desconocimiento total de la enfermedad, no existe ninguna campaña que dé a conocer más acerca de este parásito, por lo tanto el control de Neospora caninum está en etapa inicial

.

5.2 Recomendaciones

1. Al comprobar la presencia de Neospora caninum en esta zona, se recomienda realizar el diagnóstico de la enfermedad de manera rutinaria con la finalidad de descartar su presencia, especialmente cuando llega un nuevo animal al país y como parte del examen general anual.

2. Hace falta estudios a mayor escala en la ciudad, así mismo como en zonas aledañas a Quito, con el fin de establecer la prevalencia, su implicación directa o indirecta de la enfermedad y confirmar los hallazgos para generar una base de datos que oriente al veterinario acerca del alcance de esta enfermedad.

3. Utilizar la información encontrada para justificar el desarrollo de un posible programa de control, basado en los factores de riesgos hallados en el presente estudio con el fin de darnos datos precisos si en verdad esos factores son importantes a considerar.

4. Considerar a Neospora caninum como diagnóstico diferencial de enfermedades neurológicas.

REFERENCIAS

Álvarez García, G. (2003). Identificación y Caracterización de antígenos de Neospora caninum con interés inmunodiagnóstico en bovinos. (Tesis doctoral). Departamento de Sanidad animal. Universidad Complutense. Madrid, España.

Álvarez, R. (2007) Terapias de conducta: los efectos del estrés. Todo Perros, vol.49 (n°1), p. 11-14.

Anderson, M., Blanchard, P., Barr, B., Dubey, J., Hoffman, R., Conrad, P. (1991). Neospora-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association, vol.198 (n°2), p. 241-244.

Atkinson, R., Harper, P., Ryce, C., Morrison, D., Ellis, J.(1999). Comparison of the biological characteristics of two isolates of Neospora caninum. Parasitology Today, vol.118 (n°4), p. 363-370.

Bañales, P., Delucchi, L., Easton, C., Piaggio, J. (2012). Neosporosis. Recuperado el 28 de Agosto de 2012, de produccionbovina:http://www.produccionbovina.com/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/129-neosporosis-11.pdf.

Barber, J., Holmdahl, O., Owen, M., Guy, F., Uggla, A., Trees, A. (1995). Characterization of the first European isolate of Neospora caninum (Dubey, Carpenter, Speer, Topper and Uggla). Journal Parasitology, vol.111 (n°5), p. 563-568.

Barr, B., Anderson, M., Dubey, J., Conrad, P. (1991a). Neospora-like protozoal infections associated with bovine abortions. Veterinary Pathology, vol.28 (n°2), p. 110-116.

Bjerkas, I., Presthus, J.(1989). The neuropathology in toxoplasmosis-like infection caused by a newly recognized cyst-forming sporozoon in dogs. Acta Pathologica, Microbiologica, et Inmunologica, vol.97 (n°5), p. 459-468.

Campero, M. (2006). Actualización en neosporosis bovina. Producción de animales de carne, vol.1 (n°1), p. 430-434

Cheadle, M., Spencer, J., Blagburn, B. (1999). Seroprevalences of Neospora caninum and Toxoplasma gondii in nondomestic felids from southern Africa. Journal for Zoo and Wildlife Medicine, vol.30 (n°2), p. 248-251

Cordero del Campillo, M., Rojo Vásquez, F. (1999). Parasitología Veterinaria. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana.

Cornejo Prado, N. (2004). Seroprevalencia de N. caninum en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del valle del Mantaro. (Tesis doctoral). Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Cruz Montenegro, M. (2011). *Identificación del Parásito "*Neospora caninum*" en* bovinos por medio del método de Elisa, en las haciendas ganaderas del cantón Tulcán en la provincia del Carchi. (Tesis doctoral). Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. Universidad de las Américas. Quito, Ecuador.

Dubey, J., Carpenter, J., Speer, C., Topper, M., Uggla, A. (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association, vol.192 (n°9), p. 1269-1285.

Dubey, J., Hattel, A., Lindsay, D., Topper, M.(1988b). Neonatal Neospora caninum infection in dogs: isolation of the causative agent and experimental transmission. Journal of the American Veterinary Medical Association, vol.193 (n°10), p. 1259-1263).

Dubey, J., Lindsay, D. (1989b). Transplacental Neospora caninum infection in dogs. American Journal of Veterinary Research, vol.50 (n°9), p. 1578-1579.

Ettinger, S., Feldman, E. (2007). Tratado de Medicina interna veterinaria, Enfermedades del perro y gato. Madrid, España: Elsevier S.A.

Fernández Chaparro, M. (2010). Neosporosis Bovina: Medidas de Control. (Tesis doctoral). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Tandil, Buenos Aires.

Flores Yánez, C. (2006). Detección serológica de Neospora caninum en perros procedentes de tres diferentes grupos periféricos de la Región Metropolitana. (Tesis doctoral). Departamento de Patología. Universidad Iberoamericana de Ciencias y Tecnología. Santiago, Chile.

Fuchs, N., Sonda, S., Gottstein, B., Hemphill, A.(1998). Differential expression of cell surface and dense granule-associated Neospora caninum proteins in tachyzoites and bradyzoites. The Journal Parasitology, vol.84 (n°4), p. 753-758.

Galindo, E., (2006). Estadística, Métodos y Aplicaciones. Quito, Ecuador: Prociencia Editores.

Gamón, J. (2010). Detección de Anticuerpos de Neospora caninum en la zona Norte de la cuenca lechera del Departamento de Santa Cruz. (Tesis doctoral). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. Santa Cruz, Bolivia.

Gerosa, R. (2007) Geriatría Canina. Buenos Aires, Argentina: Intermédica.

Gómez, N., Guida., N. (2010). Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos. Buenos Aires, Argentina: Intermédica.

González, L., Buxton, D., Atxaerandio, R., Aduriz, G., Maley, S., Marco, J., Cuervo, L. (1999). Bovine abortion associated with Neospora caninum in northern Spain. The Veterinary Record, vol. 144 (n°6), p. 145-150.

Graham, D., Calvert, V., Whyte, M., Marks, J. (1999). Absence of serological evidence for human Neospora caninum infection. The Veterinary Record, vol.144 (n°24), p. 672-673.

Granillo Villegas, G., Martinez, J. (2008). Determinación serológica de Neospora caninum en canis domesticus en tres ganaderías lecheras del departamento de Sonsonate de el Salvador. (Tesis doctoral). Departamento de Medicina Veterinaria. Universidad de el Salvador. San Salvador, Salvador.

Greene, C. (2008) Enfermedades infecciosas del perro y el gato. Buenos Aires, Argentina: Intermedica.

Howe, D., Sibley, L. (1999). Comparison of the major antigens of Neospora caninum and Toxoplasma gondii. International Journal for Parasitology, vol.29 (n°10), p. 1489-1496.

Jacobson, L., Jardine, J. (1993). Neospora caninum infection in three labrador littermates. Journal of the South African Veterinary Association, vol.64 (n°1), p. 47-51.

Jiménez Santizo, D. (2010). Determinación de la presencia de anticuerpos contra Neospora caninum en bovinos de tipo lechero, en la finca San Julián. (Tesis doctoral). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de San Carlos de Guatemala. San Carlos, Guatemala.

Keller, N., Naguleswaran, A., Cannas, A., Vonlaufen, N., Bienz, M., Björkman, C., Bohne, W., Hemphill, A. (2002). Identification of a Neospora caninum microneme protein (NcMIC1) which interacts withsulfated host cell surface glycosaminoglycans. Infection and Immunity, vol.70 (n°6), p. 3187-3198.

Lindsay, D., Dubey, J. (1990a). Effects of sulfadiazine and amprolium on Neospora caninum (Protozoa: Apicomplexa) infections in mice. The Journal Parasitology, vol.76 (n°2), p. 177-179.

Lindsay, D., Dubey, J. (1990b). Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of Neospora caninum (Protozoa: Apicomplexa). The Journal of Parasitology. vol.76 (n°3), p. 410-413.

Lindsay, D., Lenz, S., Cole, R., Dubey, J., Blagburn, B.(1995a). Mouse model for central nervous system Neospora caninum infections. The Journal of Parasitology, vol.81 (n°2), p. 313-315.

Lindsay, D., Ritter, D., Brake, D. (2001a). Oocyst excretion in dogs fed mouse brains containing tissue cysts of a cloned line of Neospora caninum. The Journal of Parasitology, vol.87 (n°4), p. 909-911.

López Pérez, I. (2010). Desarrollo de un modelo murino gestante de la infección por Neospora caninum. (Tesis doctoral). Departamento de Sanidad Animal. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Lorenzo, V., Bernardini, M. (2007) Neurología del perro y el gato. Buenos Aires, Argentina: Intermédica.

Lozada, E. (2004). Determinación de la presencia de anticuerpos a Neospora caninum en hatos lecheros de la sierra Centro Norte del Ecuador, por Prueba Inmunoenzimática. (Tesis doctoral). Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador.

Marsh, A., Barr, B., Madigan, J., Lakritz, J., Nordhausen, R., Conrad, P. (1996). Neosporosis as a cause of equine protozoal myeloencephalitis. Journal of the American Veterinary Medical Association, vol.209 (n°11), p. 1907-1913.

Marsh, E., Barr, C., Packham, E., Conrad., A.(1998). Description of a new Neospora species (Protozoa: apicomplexa: Sarcocystidae). The Journal of Parasitology, vol.84 (n°5), p. 983-991.

Martínez Contreras, A. (2012). Actualización de la Neosporosis Bovina. Conexión Agropecuaria, vol. 2 (n° 1), p. 49-66.

McAllister, M., Dubey, J., Lindsay, D., Jolley, W., Wills, R., McGuire, A. (1998). Dogs are definitive hosts of Neospora caninum. International Journal for Parasitology, vol.28 (n°9), p. 1473-1478.

McGuire, A., McAllister, M., Jolley, W. (1997a). Separation and cryopreservation of Neospora caninum tissue cysts from murine brain. The Journal of Parasitology, vol.83 (n°2), p. 319-321.

Mineo, T., Silva, D., Costa, G., von Ancken, A.., Kasper, L., Sounza, M., Cabral, D., Costa, A., Mineo, J. (2001) Detection of IgG antibodies to Neospora caninum and Toxoplasma gondii in dogs examined in a veterinary hospital from Brazil. Veterinary Parasitology, vol. 98 (n°4), p. 239-245.

Morales, C. Montoliu, P. (2012). Neurología canina y felina. Barcelona, España: Multimédica Ediciones Veterinarias.

Moreno Boaventura, C. (2008). Prevalência de Neospora caninum em cães de Goiânia. Revista de Patología Tropical, vol. 37 (n°1), p. 15-22.

Mucha, C., Sorribas, C., Pellegrino, F. (2005) Consulta rápida en la clínica diaria. Buenos Aires: Argentina: Intermédica.

Pabón Valverde, M. (2007). Estudio de la neosporosis en vacuno lechero en Cataluña. (Tesis doctoral). Departamento de Sanidad y Anatomía animales. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

Patitucci, A., Phil, M., Pérez, M. (2001). Neosporosis canina: Presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. Archivos de Medicina Veterinaria, vol. 33 (n° 2), p. 227-232.

Pérez Zaballos, F. (2004). *Variabilidad adaptativa y patogénica en "*Neospora caninum*".* (Tesis doctoral). Departamento de Sanidad Animal. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Petersen, E., Lebech, M., Jensen, L., Lind, P., Rask, M., Bagger, P., Bjorkman, C., Uggla, A. (1999). Neospora caninum infection and repeated abortions in humans. Emerging Infectious diseases, vol.5 (n°2), p. 278-280.

Pierick, R. (1987). In vitro Culture of Higher Plants Marthinus Nihoff Publishers. Dordechet, Paises Bajos: Kluber Academic Publishers.

Pita, S., Pertégas., S. (2013) Pruebas diagnósticas: Sensibilidad y especificidad. Recuperado el 27 de Enero de 2013, de fisterra: http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebas_diagnosticas/pruebas_diagnosticas.asp.

Plumb, D., Pharm C. (2006). Manual de farmacología Veterinaria. Buenos Aires Argentina: Intermédica.

Ramsey, I., Teninant, B. (2006). Manual de enfermedades infecciosas en pequeños animales. Madrid, España: Edisiones S.

Rettigner, C., De Meerschman, F., Focant, C., Vanderplasschen, A., Losson, B. (2004). The vertical transmission following the reactivation of a Neospora caninum chronic infection does not seem to be due to an alteration of the systemic immune response in pregnant CBA/Ca mice. Parasitology, vol.128 (n°2), p. 149-160.

Risco Castillo, V, (2008). Identificación y caracterización de antígenos *específicos de estadio de bradizoíto de "*Neospora caninum*"*. (Tesis doctoral). Departamento de Sanidad Animal. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Rodríguez Romero, G. (2009). Neosporosis en la ganadería pecuaria del Perú. (Tesis doctoral). Departamento de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Rossi, V. (2002). El Gran libro de los perros de raza. Barcelona, España: De Vecchi.

Ruiz Ríos, N. (2009). Frecuencia de anticuerpos IgG contra Neospora caninum y Toxoplasma gondii en canes con signos clínicos de afección neuromuscular en la Clínica de Animales Menores de la FMV-UNMSM. (Tesis doctoral). Departamento de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

Sáenz Aguirre, S. (2008). Evaluación del efecto del uso de la vacuna (Bovilis®Neoguard) en la reducción de la tasa de abortos en cuatro haciendas de la sierra Ecuatoriana. (Tesis doctoral). Colegio de Ciencias de la Salud, programa de Medicina Veterinaria. Universidad San Francisco de Quito. Quito, Ecuador.

Schock, A., Innes, E., Yamane, I., Latham, S., Wastling, J. (2001). Genetic and biological diversity among isolates of Neospora caninum. Parasitology, vol.123 (n°1), p. 13-23

Sonda, S., Fuchs, N., Gottstein, B., Hemphill, A. (2000). Molecular characterization of a novel microneme antigen in Neospora caninum. Molecular and Biochemical Parasitology, vol.108 (n°1), p. 39-51.

Speer, C., Dubey, J. (1989). Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of Neospora caninum. The Journal Protozoology, vol.36 (n°5), p.458-463.

Thilsted, J., Dubey, J.(1989). Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. Journal of Veterinary. Diagnostic Investigation, vol.1 (n°3), p. 205-209.

Tranas, J., Heinzen, R., Weiss, L., McAllister, M. (1999). Serological evidence of human infection with the Protozoan Neospora caninum. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, vol.6 (n°5), p. 765-767.

Trees, A., Williams, D. (2000). Neosporosis in the United Kingdom. International Journal for Parasitology. Vol.30 (n°1), p. 891-893.

Varandas, N., Rached, P., Nogueira, G., Melo, L., Carrao, K., Da Costa, A. (2001). Frequency of antibodies for Neospora caninum and Toxoplasma gondii in dogs in northest of Sao Paolo State. Ciencias Agrarias Londrina, vol.22 (n°1), p. 105-111.

Venturini, C. (2007). Neosporosis. Recuperado el 15 Enero de 2013, de neospora: http://www.neospora.com.ar/4_neos.htm.

Vonlaufen, N. (2003). Hiding inside the host: Development and application of Neospora caninum bradyzoite in vitro culture. (Tesis doctoral). Departamento de Ciencias Naturales. Universidad de Basel, Basel, Suiza.

Weiss, L., Kim, K. (2007). Toxoplasma gondii: the model apicomplexan perspectives and methods. Gran Bretaña: Elsevier.

ANEXOS

ANEXO N° 1

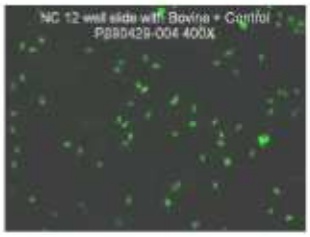
CERTIFICADO DE LA PRUEBA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA NEOSPORA CANINUM

VMRD
PO Box 502, Pullman, WA 99163 USA

Telephone: 509-334-5815
Fax: 509-332-5356
E-mail: vmrd@vmrd.com
Web site: http://www.vmrd.com

Certificate of Analysis

NEOSPORA CANINUM
FA Substrate Slide



CATALOG NO.: SLD-IFA-NC
SIZE: 12 Well
LOT: P090429-004
EXPIRATION: 28 May 2011

AGENT: *Neospora caninum*
STRAIN: NC-1

CELL CULTURE SUBSTRATE: Vero cells

DESCRIPTION: Slides contain *Neospora caninum*-infected Vero cultures spotted on the surface of teflon-masked slides. The majority of the protozoa are extracellular. They are supplied fixed and unstained in moisture-free pouches.

QUALITY CONTROL METHOD: Indirect FA using VMRD Inc. *N. caninum* Bovine Positive Control (211-P-NC-BOV), *N. caninum* Canine Positive Control (211-P-NC-CAN), *N. caninum* Bovine Negative Control (211-N-NC-BOV), *N. caninum* Canine Negative Control (211-N-NC-CAN), Anti-Bovine $IgG_{1,2}$ FITC Conjugate (020-1 or 020-10), Anti-Canine IgG FITC Conjugate (035-1 or 035-10).

Specific Reaction: 4+ and no background with both Bovine and Canine positive controls.
Negative and no background with Bovine and Canine negative controls.
Organisms per high power field are too numerous to count.

Other Comments: NA

PATTERN OF FLUORESCENCE: Organisms with bright diffuse or peripheral fluorescence.

INTERPRETATION OF RESULTS: Bovine sera should be screened at 1:200 for IgG. Canine sera should be screened at 1:50 for IgG. Diffuse or peripheral staining is considered positive. As is the case with *Toxoplasma*, apical (polar) staining is not considered positive.

INTENDED USE: Generally used for Indirect FA to detect antibody to *Neospora caninum* but may also be used as a positive and negative control substrate slide for Direct FA conjugates when applicable, and to differentiate antibody class (IgG or IgM) with suitable quality fluorescein-ated second antibody conjugate

STORAGE: Store sealed in foil pouch at -20°C. Avoid self-defrosting freezers.

REFERENCES: NA

FOR *IN VITRO* LABORATORY USE ONLY.

WARRANTY: VMRD, Inc. warrants that this product is as described in the quantity and contents stated on the label at the time of delivery to the customer. NO OTHER WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED, ARE MADE BEYOND THE LABEL DESCRIPTION, INCLUDING WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR USE. Remedy is limited to replacement of the product or refund of the purchase price. VMRD, Inc. is not liable for property damage, personal injury, or economic loss caused by the product. The information listed in this information sheet is provided for reference only, and should not be substituted for the user's own incoming material quality control.

H:\Quality VMRD\COofA\8-, 10-, 12-well Slides\Neospora caninum\NC 12 well slide SLD-IFA-NC P090429-004 110528.doc
08 June 2006

Tomado de: Veterinary medical researc & developed (VMRD), Inc.(2012).

CERTIFICADO DE LA PRUEBA INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA NEOSPORA CANINUM

RECOMMENDED STAINING PROCEDURE FOR INDIRECT FA:

1. Warm slide to room temperature before removing from foil pouch.
2. Place 50 µl diluted serum on the designated wells. Dilute serum in serum diluting buffer, pH 7.2 (catalog no. 210-93-SB).
3. Incubate slide in humid chamber at 37°C for 30 minutes.
4. Using a wash bottle, gently rinse slide briefly in FA rinse buffer, pH 9.0 (catalog no. 210-90-RB) and then soak for 10 minutes in FA rinse buffer, pH 9.0.
5. Drain slide and dry around wells by pressing blotter (included in pouch) to front surface. Place 50 µl labeled anti-IgG or IgM on the wells.
6. Incubate as in step 3.
7. Rinse as in step 4.
8. Drain slide and dry back and edges with a paper towel. Do not allow stained surface to dry. Do not rinse with water.
9. Mount with mounting fluid [glycerol/FA rinse buffer, pH 9.0, (50/50)] (catalog no. 210-92-MF) and view with good quality fluorescence microscope at 100X-250X. Confirmation may be made at 400X.

RECOMMENDED STAINING PROCEDURE FOR DIRECT FA:

1. Warm slide to room temperature before removing from foil pouch.
2. Place 50 µl of direct FA conjugate on the designated wells.
3. Incubate slide in humid chamber at 37°C for 30 minutes.
4. Using a wash bottle, gently rinse slide briefly in FA rinse buffer, pH 9.0 (catalog no. 210-90-RB) and then soak for 10 minutes in FA rinse buffer, pH 9.0.
5. Drain slide and dry back and edges with a paper towel. Do not allow stained surface to dry. Do not rinse with water.
6. Mount with mounting fluid [glycerol/FA rinse buffer, pH 9.0, (50/50)] (catalog no. 210-92-MF) and view with good quality fluorescence microscope at 100X-250X. Confirmation may be at 400X.

SERUM DILUTING BUFFER (pH 7.2):*

- Na_2HPO_4 ..... 1.19 gm
- NaH_2PO_4 ..... 0.22 gm
- NaCl ..... 8.55 gm
- BSA ..... 10.0 gm
- DI/dH_2O ..... Q.S. to 1 liter

* This recipe makes 1 liter. If you need less, adjust recipe accordingly. Store at 2-7°C. Add 0.09% NaN_3 if diluted serum is not going to be used within one week.

4X FA RINSE BUFFER (pH 9.0):

- Na_2CO_3 ..... 11.4 gm
- $NaHCO_3$ ..... 33.6 gm
- NaCl ..... 8.5 gm
- DI/dH_2O ..... Q.S. to 1 liter

Final pH should be 9.0-9.5. This is a 4X concentrate and should be diluted 1:4 with DI/distilled water for use as a working buffer. Keep in a tightly stoppered container at room temperature. MOUNTING FLUID is made by mixing glycerol and FA rinse buffer, pH 9.0, in equal proportions.

Tomado de: Veterinary medical researc & developed (VMRD), Inc.(2012).

ANEXO N° 2

ENCUESTA PARA ESTUDIO DE *NEOSPORA CANINUM*

Hospital - Clínica:_____ Fecha:_____

Información general

Nombre del Propietario:_____

Teléfono:_____

Dirección:_____ e-mail:_____

Nombre del Paciente:_____

Edad:_____

Sexo:_____ Raza:_____

Información Específica

1.- ¿Cuál es la procedencia de su mascota?

Ciudad_____ Provincia_____ País_____

2.- ¿Dónde vive su mascota?

Ciudad_____Campo_____

3.- ¿Si su mascota vive en la ciudad, ha ido al campo en últimos 6 meses?

SÍ ☐ NO ☐

4.- Su mascota ha presentado signología neural, en los últimos 6 meses?

SÍ ☐Cuál?_____ NO ☐

5.- ¿Su mascota ha sido sometida a algún tratamiento con glucocorticoides, en los últimos 6 meses?

SÍ ☐ NO ☐

6.- ¿Convive su mascota con otros animales domésticos?

SÍ ☐Cuáles?_____ NO ☐

7.- ¿Han habido partos de perras en casa en los últimos 6 meses?

SÍ ☐ NO ☐

8.- Si la perra parió ¿El / los cachorros de esta última camada, han muerto?

SÍ ☐ NO ☐

9.- ¿Han habido abortos de perras en casa en los últimos 6 meses?

SÍ ☐ NO ☐

10.- Si la perra abortó ¿ha presentado signos neurales en los últimos 6 meses?

SÍ ☐Cuál?_____ NO ☐

11.-¿Su mascota ha ingerido carne / residuos de bovino, ovino ó caprino; en los últimos 6 meses?

SÍ ☐crudas ___ cocidas ___NO ☐

ANEXO N° 3

CARTA DE CONSENTIMIENTO Y COMPROMISO

1.- Carta de consentimiento

Yo _____ autorizo a la señorita Diana Carolina Recalde Salazar para que utilice la muestra de mi mascota de nombre _____ para realizar el estudio epidemiológico titulado "***Determinación serológica de neospora caninum en pacientes caninos de dos clínicas veterinarias al norte de Quito".*** A desarrollarse en Hospital-Clínica _____, del norte de Quito.

Firma_____ Fecha_____

2.- Carta de compromiso

Yo Diana Carolina Recalde Salazar me comprometo con el señor(a)_____ propietario de la mascota de nombre _____ a entregar los resultados del diagnostico de ***Neospora caninum*** analizados a través de la prueba **IFI (Inmunofluorescencia indirecta).**

En caso de que su mascota resultara positivo, me comprometo a realizar el seguimiento del caso y a proporcionar mis conocimientos profesionales para el tratamiento, y a la administración de los medicamentos; el costo de los medicamentos correrá por cuenta del propietario.

Firma _____ Quito, fecha_____

Diana Carolina Recalde Salazar

ANEXO N° 4

ANUNCIO Y TRÍPTICOS UTILIZADOS PARA DAR INFORMACIÓN A DUEÑOS DE CANINOS ACERCA DE LA INVESTIGACIÓN DE *NEOSPOROSIS CANINUM*A REALIZARSE EN DOS CLÍNICAS VETERINARIAS AL NORTE DE QUITO.

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

DETERMINACIÓN SEROLÓGICA DE *NEOSPORA CANINUM* EN PACIENTES CANINOS DE DOS CLINICAS VETERINARIAS AL NORTE DE QUITO

En la actualidad ha adquirido importancia una enfermedad infecciosa que afecta a una serie de animales mamíferos, dentro de estos a los perros, llamada **Neosporosis canina**, la cual ha sido subdiagnosticada y confundida con otras enfermedades de signología nerviosa.

En los caninos clínicamente se afectan tanto cachorros como perros de más edad y la infección puede transmitirse de forma intrauterina. En la mayoría de los casos los signos son una parálisis ascendente de los miembros posteriores, flácida o espástica, siendo más afectados cachorros menores a 6 meses. La infección puede diseminarse en todo el organismo y afectar diversos órganos hasta provocar la muerte.

En el ciclo biológico del parásito, el perro actúa como hospedador definitivo y los bovinos como hospedadores intermediarios. En relación a la infección por *N. caninum* en el perro, se ha sugerido que los perros importados y los que viven en el campo junto a bovinos, podrían tener un papel importante en la epidemiología de la neosporosis canina.

Este estudio tiene como objetivo importante la detección serológica de *Neospora caninum* en perros importados, trasladados de campo a cuidad o viceversa y de origen del distrito metropolitano, aparentemente sanos o con signología compatible a la enfermedad, para así informar a los propietarios la prevención y control en los caninos seropositivos.

Con la finalidad de informar a la población, se ha programado dar una charla a los propietarios de las mascotas que colaboren en el estudio acerca de esta enfermedad, posteriormente, se procederá a realizar un chequeo completo y diagnostico serológico GRATUITO al canino.

Los resultados serán entregados vía e-mail, en donde se interpretara los resultados, en caso de que la mascota resulta ser seropositiva, se le asignara la fecha de la próxima cita en donde se le indicará al propietario las recomendaciones del tratamiento y el control de la Neosporosis canina.

Para la realización de este estudio, se cuenta con la autorización respectiva de las autoridades de Hospital Veterinario “Mascotas”, Clínica Veterinaria “Perros & Gatos” y la dirección del Dr. Freedy Proaño, docente de la universidad de las Américas.

Tríptico para los propietarios

Neosporosis canina

En la actualidad ha adquirido importancia una enfermedad infecciosa que afecta a una serie de animales mamíferos, dentro de estos a los perros, llamada **Neosporosis canina**, la cual ha sido subdiagnosticada y confundida con otras enfermedades de signología nerviosa.

En los caninos, clínicamente se afectan tanto cachorros como perros adultos y la infección puede transmitirse de forma intrauterina. En la mayoría de los casos los signos son una parálisis de los miembros posteriores, flácida o espástica, siendo más afectados cachorros menores a 6 meses. La infección puede diseminarse en todo el organismo y afectar diversos órganos hasta provocar la muerte.

En el ciclo biológico del parásito (*fig.*1), el perro actúa como hospedador definitivo y los bovinos como hospedadores intermediarios. En relación a la infección por *N. caninum* en el perro, se ha sugerido que los perros importados y los que viven en el campo junto a bovinos, podrían tener un papel importante en la epidemiología de la neosporosis canina.

Este estudio tiene como objetivo importante la detección serológica de *Neospora caninum* en perros importados, trasladados de campo a cuidad o viceversa y de origen del distrito metropolitano de Quito, aparentemente sanos o con signología compatible a la enfermedad, para así informar a los propietarios la prevención y control en los caninos seropositivos.

Con la finalidad de informar a la población, se ha programado dar una charla a los propietarios de las mascotas que colaboren en el estudio acerca de esta enfermedad, posteriormente, se procederá a realizar un chequeo completo y diagnóstico serológico GRATUITO al canino.

Los resultados serán entregados vía e-mail, en donde se interpretarán los resultados, en caso de que la mascota resulta ser seropositiva, se le asignará la fecha de la próxima cita en donde se le indicarán al propietario las recomendaciones del tratamiento y el control de la Neosporosis canina.

Para la realización de este estudio, se cuenta con la autorización respectiva de las autoridades de Hospital Veterinario "Mascotas", Clínica Veterinaria "Perros & Gatos" y la dirección del Dr. Freedy Proaño, docente de la Universidad de las Américas.

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

PARA MAS INFORMACIÓN COMUNICARSE CON LA SRTA. DIANA RECALDE

Teléfono: (claro) 0994370165
Domicilio: 2-803945
Trabajo: 2-595259
Correo: garota182006@hotmail.com

udla
UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS

DETERMINACIÓN SEROLÓGICA DE *NEOSPORA CANINUM* EN PACIENTES CANINOS DE DOS CLINICAS VETERINARIAS AL NORTE DE QUITO

Fig. 1 Ciclo Biológico del parásito

ANEXO N° 5

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS.

Hospital Veterinario "Mascotas"

Clínica Veterinaria "Perros & Gatos"

ANEXO N° 6

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Examen General

Toma de muestra sanguínea

Traspaso de sangre venosa de jeringa a tubos vacutainer

ANEXO N° 7

MATERIALES DE CAMPO Y LABORATORIO

CAMPO

Jeringas 3 ml estériles y agujas 20GX1½", 23GX1¼"

Tubos estériles sin anticoagulante (tubo rojo vacutainer)

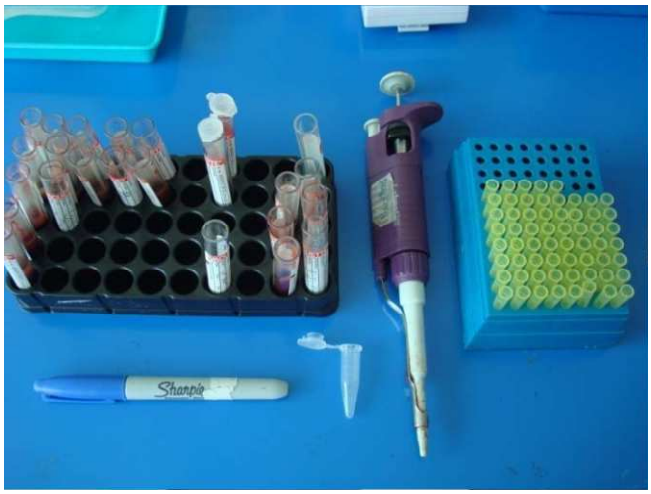
LABORATORIO

Balanza

Centrífuga de 2000 rpm

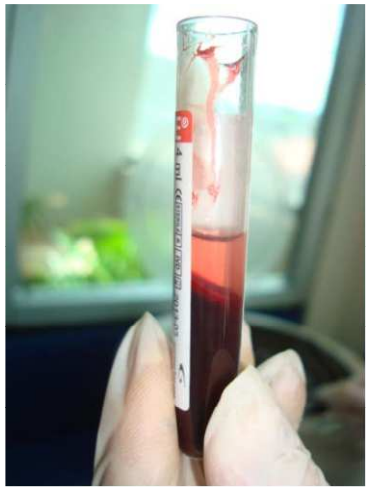
Vortex

Gradilla, Tubos ependorf, pipeta automatica y puntas amarrillas



Cámara Húmeda

Suero (1ml)



Láminas NC-1 *Nespora caninum* de 12 posillos

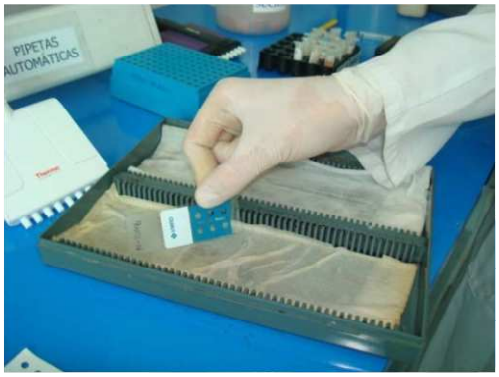
Anti-IgG1 canino con isotiocianato de fluroesceína (FITC)

Fluido de Montaje (Glicerina Tamponada)

Microscopio de Fluorescencia

ANEXO N° 8

DETECCIÓN DE TÍTULOS DE ANTICUERPOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)



ANEXO N° 9

RESULTADOS DE LA ENCUESTA

Codificación de datos:

Edad: 0 (no contesta); 1 (≤ 3 años); 2 (4 - 7 años); 3 (≥ 8 años).
Sexo: 0 (no contesta); 1 (hembra); 2 (Macho).
Raza: 0 (no contesta); 1 (Beagle); 2 (Boxer); 3(Bulldog Ingles; 4 (Castellano); 5 (Cocker); 6 (Collie); 7 (Dachshund); 8 (Dálmata); 9 (Doberman Pincher); 10 (French Poodle); 11 (Golden Retriever); 12 (Jack Russell Terrier); 13 (Labrador); 14 (Mastín Napolitano); 15 (Mestizo); 16 (Pastor Alemán); 17 (Pit Bull); 18 (Pointer); 19 (Rottweiler); 20 (Schnawzer); 21 (Shar-pei);22 (Shit-zu); 23 (Weimaraner); 24(Yorkshire Terrier).
Resultado de laboratorio: 0 (no contesta); 1 (positivo); 2 (negativo).
1.- ¿Cuál es la procedencia de su mascota?: 0 (no contesta); 1 (Quito); 2 (otra ciudad); 3 (otro país).
2.- ¿Dónde vive su mascota?: 0 (no contesta); 1 (ciudad; 2 (campo).
3.- ¿Si su mascota vive en la ciudad, ha ido al campo en últimos 6 meses?: 0 (no contesta); 1 (Sí); 2(No).
4.- Su mascota ha presentado signología neural, en los últimos 6 meses?: 0 (no contesta); 1 (Sí); 2(No).
4.1.- ¿Cuál?: 0 (no contesta); 1 (Ataxia); 2 (Atrofia muscular); 3 (Disfagia); 4 (Flacidez muscular); 5 (Hiperestesia); 6 (Hiperextensión rígida); 7 (Incoordinación); 8 (Mialgia - Músculos Abdominales); 9 (Mialgia - Músculos Cuádriceps); 10 (Mialgia - Músculos Diafragmático); 11 (Mialgia - Músculos Gastronemio); 13 (Mialgia - Músculos Lumbares); 14 (Mialgia - Músculos Masetero); 15 (Neuritis); 16 (Nistagmo); 17 (Parálisis de la mandíbula); 18 (Parálisis Flácida); 19 (Parálisis Espástica); 20 (Paresia bilateral); 21 (Paresia unilateral); 22 (Ptosis); 23 (Reflejo patelar disminuido); 24 (Reflejo pupilar lento).

5.- ¿Su mascota ha sido sometida a algún tratamiento con glucocorticoides, en los últimos 6 meses?: 0 (no contesta); 1 (Sí); 2(No).

6.- ¿Convive su mascota con otros animales domésticos?: 0 (no contesta); 1 (Sí); 2 (No).

6.1.- ¿Cuáles?: 0 (no contesta); 1 (Caballo(s)); 2 (Cabra(s)); 3 (Cerdo(s)); 4 (Gato(s)); 5 (Oveja(s)); 6 (Perro(s)); 7 (Perro(s) y Vaca(s)); 8 (Vaca(s)).

7.- ¿Han habido partos de perras en casa en los últimos 6 meses?: 0 (no contesta); 1 (Sí); 2(No).

8.- Si la perra parió ¿El / los cachorros de esta última camada, han muerto?: 0 (no contesta); 1 (Sí); 2(No).

9.- ¿Han habido abortos de perras en casa en los últimos 6 meses?: 0 (no contesta); 1 (Sí); 2(No).

10.- Si la perra abortó ¿ha presentado signos neurales en los últimos 6 meses?: 0 (no contesta); 1 (Sí); 2(No).

10.1.- ¿Cuál?: 0 (no contesta); 1 (Ataxia); 2 (Atrofia muscular); 3 (Disfagia); 4 (Flacidez muscular); 5 (Hiperestesia); 6 (Hiperextensión rígida); 7 (Incoordinación); 8 (Mialgia - Músculos Abdominales); 9 (Mialgia - Músculos Cuádriceps); 10 (Mialgia - Músculos Diafragmático); 11 (Mialgia - Músculos Gastronemio); 13 (Mialgia - Músculos Lumbares); 14 (Mialgia - Músculos Masetero); 15 (Neuritis); 16 (Nistagmo); 17 (Parálisis de la mandíbula); 18 (Parálisis Flácida); 19 (Parálisis Espástica); 20 (Paresia bilateral); 21 (Paresia unilateral); 22 (Ptosis); 23 (Reflejo patelar disminuido); 24 (Reflejo pupilar lento).

11.- ¿Su mascota ha ingerido carne / residuos de bovino, ovino ó caprino; en los últimos 6 meses?: 0 (no contesta); 1 (Sí); 2(No).

11.1.- ¿Cuál?: 0 (no contesta); 1 (Cocida); 2 (Cruda); 3 (Semicocida).

Tabla de resultados encuesta:

# Caso lab	Edad	Sexo	Raza	test	P1	P2	P3	P4	P4.1	P5	P6	P6.1	P7	P8	P9	P10	P10.1	P11	P11.1
N-1648-1	1	1	14	neg	1	2	1	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	3
N-1648-2	2	1	3	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-3	1	2	15	neg	1	1	2	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-4	1	2	20	neg	1	1	2	1	14	1	2	0	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-5	2	2	15	neg	3	1	1	2	0	2	1	7	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-6	1	2	3	neg	1	1	1	2	0	1	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-7	1	1	11	neg	1	1	1	1	19	1	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-8	1	1	9	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-9	2	1	9	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-10	3	2	5	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-11	3	2	21	neg	1	1	2	2	0	1	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-12	3	2	17	neg	2	1	2	1	7	1	2	0	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-13	2	1	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-14	3	1	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-15	1	2	13	neg	1	2	1	2	0	2	1	7	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-16	1	2	13	neg	1	2	1	2	0	2	1	7	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-17	1	2	13	neg	1	2	1	2	0	2	1	7	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-18	2	2	11	neg	1	2	1	2	0	1	1	7	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-19	3	2	13	neg	1	2	1	2	0	2	1	7	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-20	3	2	13	pos	1	2	1	2	0	2	1	7	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-21	2	1	13	pos	1	2	1	2	0	2	1	7	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-22	1	2	13	neg	1	2	1	2	0	2	1	7	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-23	2	2	11	neg	1	2	1	2	0	2	1	7	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-24	3	2	13	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-25	3	1	17	pos	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-26	2	1	3	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-27	1	2	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-28	1	1	15	neg	1	1	2	2	0	1	1	4	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-29	3	2	17	pos	1	1	2	2	0	2	1	4	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-30	1	1	22	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	1	2	2	2	0	1	1
N-1648-31	1	1	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-32	1	2	24	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	1
N-1648-33	3	1	20	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-34	1	1	20	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-35	3	1	11	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-36	3	1	20	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-37	2	2	22	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	1	2	2	2	0	1	1
N-1648-38	1	1	2	pos	1	1	2	2	0	1	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-39	2	2	14	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	3
N-1648-40	1	1	1	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0

N-1648-41	2	1	10	neg	1	1	2	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-42	2	1	7	neg	1	1	1	2	0	2	1	8	2	2	2	2	0	1	2
N-1648-43	2	1	10	neg	1	1	2	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-44	1	2	11	neg	1	2	1	2	0	1	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-43	3	1	5	neg	1	1	2	1	7	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-46	3	2	19	neg	2	1	1	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	2
N-1648-47	2	1	19	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	2
N-1648-48	1	2	19	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	2
N-1648-49	2	1	19	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	2
N-1648-50	2	1	19	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	2
N-1648-51	1	1	10	neg	1	1	1	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-52	2	1	6	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	1
N-1648-53	2	2	13	neg	1	1	1	1	12	1	2	0	2	2	2	2	0	1	3
N-1648-54	3	1	15	neg	1	1	2	1	19	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-55	1	2	15	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-56	1	2	14	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	1	1	2	2	0	1	3
N-1648-57	1	2	16	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	1	2	2	2	0	2	0
N-1648-58	1	1	1	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-59	1	2	5	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-60	1	2	15	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-61	1	1	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-62	3	1	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-63	2	2	17	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-64	1	1	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-65	2	1	8	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-66	2	1	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-67	3	2	23	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-68	2	1	23	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-69	2	1	17	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-70	1	2	17	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-71	1	1	24	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-72	2	1	5	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648-73	2	2	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-74	2	2	5	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648-75	1	1	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-1	1	1	11	neg	1	1	1	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-2	2	2	15	neg	1	2	1	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-3	3	2	22	neg	1	1	2	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-4	2	1	1	neg	1	1	1	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-5	1	2	3	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-6	2	2	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648B-7	2	1	5	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-8	2	2	10	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1
N-1648B-9	2	2	20	neg	1	1	2	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0

N-1648B-10	2	2	3	neg	1	1	2	2	0	1	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-11	1	1	12	neg	2	1	1	2	0	2	1	4	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-12	1	1	13	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-13	3	2	13	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-14	2	2	2	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-15	2	1	20	neg	1	1	2	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-16	2	1	2	pos	1	1	1	1	7	2	2	0	1	2	2	2	0	1	1
N-1648B-17	2	2	2	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	0
N-1648B-18	3	2	4	neg	1	1	1	2	0	2	2	0	2	2	2	2	0	1	1
N-1648B-19	3	2	18	neg	3	1	1	2	0	2	2	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-20	3	1	18	neg	1	1	1	2	0	2	2	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-21	2	1	13	neg	1	1	1	2	0	1	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-22	1	1	20	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-23	2	2	20	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-24	2	1	20	neg	1	1	1	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	2	0
N-1648B-25	1	2	15	neg	1	1	2	2	0	2	1	6	2	2	2	2	0	1	1

ANEXO N° 10

RESULTADOS DEL LABORATORIO LIVEXLAB DE LOS CASOS SEROPOSITIVOS A *NEOSPORA CANINUM* Y EXAMEN HEMATOLÓGICO Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DEL CASO #1

Caso Clínico # 1:

● **Primer análisis de laboratorio**

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO LIVEXLAB

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
e-mail: resultados@livex.com.ec
Quito-Ecuador

Caso:	N-1648-38	**Identificación Animal:**	**Shayna**
Especie:	Canino	**Raza:**	Boxer
Edad:	3 años	**Sexo:**	Hembra
Propietario:	Rosa Vera	**Teléfono:**	0994370165
Clinica Veterinaria:	Hospital Mascotas	**Ubicación:**	Quito
Médico Remitente:	Diana Recalde	**Responsable:**	T. Montes
Muestras recibidas:	Sueros (1)	Fecha de toma de muestra:	2012-12-04
Exámenes solicitados: Neospora caninum IFI		**Tratamientos antes de la toma de muestra: No Remite**	

RESULTADOS

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/50

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	SHAYNA	POSITIVO

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/80

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	SHAYNA	POSITIVO

NOTA: Este resultado es válido únicamente para la muestra examinada en el laboratorio

ATENTAMENTE,

Micrb. Cristina Montalvo
Directora LIVEXLAB

Tcnlg. Tatiana Montes
Responsable de Calidad

● Segundo análisis de laboratorio

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO
LIVEXLAB

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
e-mail: resultados@livex.com.ec
Quito-Ecuador

Caso:	N-1648-38	**Identificación Animal:**	**Shayna**
Especie:	Canino	**Raza:**	Boxer
Edad:	3 años	**Sexo:**	Hembra
Propietario:	Rosa Vera	**Teléfono:**	0994370165
Clínica Veterinaria:	Hospital Mascotas	**Ubicación:**	Quito
Médico Remitente:	Diana Recalde	**Responsable:**	T. Montes
Muestras recibidas:	Sueros (1)	Fecha de toma de muestra:	**2013-02-25**
Exámenes solicitados: Neospora caninum IFI		**Tratamientos antes de la toma de muestra: No Remite**	

RESULTADOS

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/50

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	SHAYNA	POSITIVO

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/80

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	SHAYNA	POSITIVO

NOTA: Este resultado es válido únicamente para la muestra examinada en el laboratorio

ATENTAMENTE,

Micrb. Cristina Montalvo
Directora LIVEXLAB

Tcnlg. Tatiana Montes
Responsable de Calidad

● Examen Hematológico

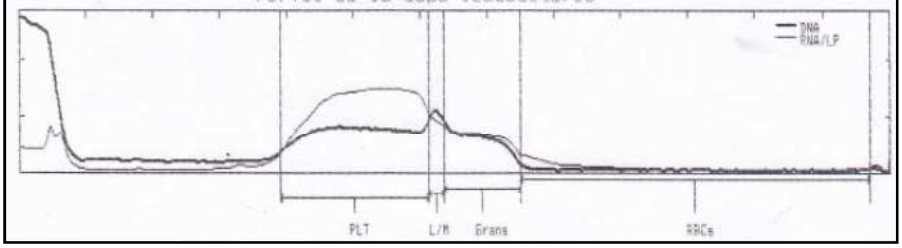
Resultados de hematología

Especie: Canino
Paciente: Shayna // 3 años // Boxer / Propietario: Rosa Vera

Vrf Software : 4.3
Fecha: 26-ENE-13 19:06

Tests		Resultados	Unidades	Rango normal	Indicador (Bajo / Normal / Alto)
HCT	=	54.5	%	37.0 - 55.0	
HGB	=	18.5	g/dl	12.0 - 18.0	
MCHC	=	33.9	g/dl	30.0 - 36.9	
WBC	=	11.0	x10*/l	6.0 - 16.9	
GRANS	=	8.3	x10*/l	3.3 - 12.0	
%GRANS	=	75	%		
L/M	=	2.7	x10*/L	1.1 - 6.3	
%L/M	=	25	%		
PLT	=	384	x10*/L	175 - 500	
Retics	~	0.3	%		

Perfil de la capa leucocitaria



● Examen de Bioquímica Sanguínea

MASCOTAS HOSPITAL VETERINARIO

Especie(s) : Perro Adulto
Paciente :SHAINA
Propietario :

Ver: 8.33A
Fecha :26-ENE-13 13:16

Prueba		Resultados	Rango de Referencia	Indicador (BAJO / NORMAL / ALTO)
ALKP	=	36 U/L	23 - 212	
ALT	=	32 U/L	10 - 100	
BUN	=	16 mg/dL	7 - 27	
CREA	=	0.6 mg/dL	0.5 - 1.8	
GLU	=	109 mg/dL	74 - 143	
TP	=	6.6 g/dL	5.2 - 8.2	

Caso Clínico # 2:

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO
LIVEXLAB

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
e-mail: resultados@livex.com.ec
Quito-Ecuador

Caso:	N-1648-20	**Identificación Animal:**	**Manch**
Especie:	Canino	**Raza:**	Labrador
Edad:	8 años	**Sexo:**	Macho
Propietario:	Marcolfa Moncayo	**Teléfono:**	0994370165
Clínica Veterinaria:	Hospital Mascotas	**Ubicación:**	Quito
Médico Remitente:	Diana Recalde	**Responsable:**	T. Montes
Muestras recibidas:	Sueros (1)	Fecha de toma de muestra:	2012-11-27
Exámenes solicitados: Neospora caninum IFI		**Tratamientos antes de la toma de muestra: No Remite**	

RESULTADOS

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/50

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	MANCH	POSITIVO

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/80

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	MANCH	POSITIVO

NOTA: Este resultado es válido únicamente para la muestra examinada en el laboratorio

ATENTAMENTE,

Micrb. Cristina Montalvo
Directora LIVEXLAB

Tcnlg. Tatiana Montes
Responsable de Calidad

Caso Clínico # 3:

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO LIVEXLAB

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
e-mail: resultados@livex.com.ec
Quito-Ecuador

Caso:	N-1648-21	**Identificación Animal:**	**Vianca**
Especie:	Canino	**Raza:**	Labrador
Edad:	7 años	**Sexo:**	Hembra
Propietario:	Luis Gerardo	**Teléfono:**	0994370165
Clínica Veterinaria:	Hospital Mascotas	**Ubicación:**	Quito
Médico Remitente:	Diana Recalde	**Responsable:**	T. Montes
Muestras recibidas:	Sueros (1)	Fecha de toma de muestra:	2012-11-27
Exámenes solicitados: Neospora caninum IFI		**Tratamientos antes de la toma de muestra: No Remite**	

RESULTADOS

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/50

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	VIANCA	POSITIVO

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/80

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	VIANCA	POSITIVO

NOTA: Este resultado es válido únicamente para la muestra examinada en el laboratorio

ATENTAMENTE,

Micrb. Cristina Montalvo
Directora LIVEXLAB

Tcnlg. Tatiana Montes
Responsable de Calidad

Caso Clínico # 4:

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO
LIVEXLAB

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
e-mail: resultados@livex.com.ec
Quito-Ecuador

Caso:	N-1648-29	**Identificación Animal:**	**Pancho**
Especie:	Canino	**Raza:**	Pitbull
Edad:	10 años	**Sexo:**	Macho
Propietario:	Patricia Lastra	**Teléfono:**	0994370165
Clínica Veterinaria:	Hospital Mascotas	**Ubicación:**	Quito
Médico Remitente:	Diana Recalde	**Responsable:**	T. Montes
Muestras recibidas:	Sueros (1)	Fecha de toma de muestra:	2012-11-27
Exámenes solicitados: Neospora caninum IFI		**Tratamientos antes de la toma de muestra: No Remite**	

RESULTADOS

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/50

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	PANCHO	POSITIVO

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/80

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	PANCHO	POSITIVO

NOTA: Este resultado es válido únicamente para la muestra examinada en el laboratorio

ATENTAMENTE,

Micrb. Cristina Montalvo
Directora LIVEXLAB

Tcnlg. Tatiana Montes
Responsable de Calidad

Caso Clínico # 5:

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO LIVEXLAB

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
e-mail: resultados@livex.com.ec
Quito-Ecuador

Caso:	N-1648-B-16	**Identificación Animal:**	**Paquita**
Especie:	Canino	**Raza:**	Boxer
Edad:	6 años	**Sexo:**	Hembra
Propietario:	Lucia Ordoñez	**Teléfono:**	0994370165
Clínica Veterinaria:	Perros y Gatos	**Ubicación:**	Quito
Médico Remitente:	Diana Recalde	**Responsable:**	T. Montes
Muestras recibidas:	Sueros (1)	Fecha de toma de muestra:	2013-01-21
Exámenes solicitados: Neospora caninum IFI		**Tratamientos antes de la toma de muestra: No Remite**	

RESULTADOS

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/50

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	PAQUITA	POSITIVO

NOTA: Este resultado es válido únicamente para la muestra examinada en el laboratorio

ATENTAMENTE,

Micrb. Cristina Montalvo
Directora LIVEXLAB

Tcnlg. Tatiana Montes
Responsable de Calidad

LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO LIVEXLAB

Caso Clínico # 6:

LABORATORIO DE DIAGNOSTICO LIVEXLAB

Carlos Alvarado N50-09 y Los Álamos
Telf: 2411-637 / 095003160 Fax: 2412-494
e-mail: resultados@livex.com.ec
Quito-Ecuador

Caso:	N-1648-25	**Identificación Animal:**	**Buba**
Especie:	Canino	**Raza:**	Pitbull
Edad:	11 años	**Sexo:**	Hembra
Propietario:	Celia Salazar	**Teléfono:**	0994370165
Clínica Veterinaria:	Hospital Mascotas	**Ubicación:**	Quito
Médico Remitente:	Diana Recalde	**Responsable:**	T. Montes
Muestras recibidas:	Sueros (1)	Fecha de toma de muestra:	2012-11-27
Exámenes solicitados: Neospora caninum IFI		**Tratamientos antes de la toma de muestra: No Remite**	

RESULTADOS

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/50

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	BUBA	POSITIVO

Prueba	**Neospora caninum**
Técnica:	**Inmunofluorescencia indirecta**
Tipo de Inmunoglobulina	IgG
Dilución	1/80

No	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
1	BUBA	POSITIVO

NOTA: Este resultado es válido únicamente para la muestra examinada en el laboratorio

ATENTAMENTE,

Micrb. Cristina Montalvo
Directora LIVEXLAB

Tcnlg. Tatiana Montes
Responsable de Calidad