

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Escuela de Posgrado

DOCTORADO EN EPIDEMIOLOGÍA

EPIDEMIOLOGÍA Y VALORES PREDICTIVOS DE LAS PRUEBAS
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA Y LA PRUEBA DE
ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO LIGADO A ENZIMAS
INDIRECTA PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS DE
LA *Neospora caninum* EN VACAS RAZA HOLSTEIN

TESIS

PRESENTADA POR:

MGR. HUGO FLORES AYBAR

Para optar el Grado Académico de:

DOCTOR EN EPIDEMIOLOGÍA

TACNA - PERÚ

2015

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN – TACNA

Escuela de Posgrado

MAESTRÍA EN GESTIÓN EMPRESARIAL

**EL CONTROL PREVIO A LA GESTIÓN ADMINISTRATIVA
Y SU INCIDENCIA EN EL PROCESO DE EJECUCIÓN DE
PAGOS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL
JORGE BASADRE GROHMANN
TACNA, AÑO - 2014**

Tesis sustentada y aprobada el 18 de setiembre del 2015; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE : 
Dr. Segundo Manuel Alvarado Contreras

SECRETARIO : 
Mgr. Luis Celerino Catacora Lira

MIEMBRO : 
Mgr. Felipe Yony Gómez Cáceres

ASESOR : 
Dr. Humberto Benito Vargas Pichón

AGRADECIMIENTO

A mi familia, en especial a mis hermanos que alentaron para seguir superándome

A mis compañeros de trabajo de la Facultad Ciencias Agropecuarias, a mis alumnos de la Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

A la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, de manera especial a mi asesora Dra. Rina María Álvarez Becerra y a quienes fueron mis profesores, incluyendo los de idiomas, que me dieron las enseñanzas para seguir avanzando en mi desarrollo académico y profesional

A mis señores juradora. Dra. Rosario Elena Zegarra Vda. de Chávez, Dr. Oscar Octavio Fernández Cutiri y Dr. Adilio Augusto Pórtelas Valverde por su apoyo.

A mis colegas Dr. Domingo Ruelas, Dr. Jesus Quispe Coaquira, Dra. Rosario Félliz Velásquez por su apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A Cbalicia Áybar Díaz mi adorable madre, cuyo infinito amor, es una luz que ilumina el sendero que voy siguiendo.

A Rosa Angélica kuong de Flores, mi venerada esposa, cuyo recuerdo de sus días terrenales me alienta a seguir luchando para superarme, ya que siempre vivirá en mi corazón y me mente.

A Róselin Paola, Cristián Hugo, Emmanuel Hugo Flores Kuong mis amados hijos, quienes son el motivo y causa de mis triunfos.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIA	iv
CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	xvi
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
ÍNDICE DE ANEXOS	xxiv
RESUMEN	xxv
ABSTRACT	xxvi
RESUMO	xxvii
INTRODUCCIÓN	01

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema.....	05
1.1.1. Problema general.....	07
1.1.2. Problemas específicos.....	07

1.2. Objetivos	08
1.2.1. Objetivo general	08
1.2.2. Objetivos específicos	09
1.3. Hipótesis	09
1.4. Justificación de la investigación	09

**CAPÍTULO II:
MARCO TEÓRICO**

2.1. Antecedentes de la investigación.....	12
2.2. Bases teóricas	18
2.2.1. Base fisiológica y epistemología	19
2.2.2. Neospora caninum	23
2.2.3. Ciclo biológico	24
2.2.4. Fases evolutivas	26
2.2.5. Epidemiología	29
2.2.6. El parásito	30
2.2.7. Hospedero	30
2.2.8. Medio ambiente	31
2.2.9. Factores de riesgo	32
2.2.10. Sexo.....	32

2.2.11. Edad de la madre.....	32
2.2.12. Aborto	33
2.2.13. Gestación.....	33
2.2.14. Transmisión lacto génica	34
2.2.15. Introducción de ganado nuevo al hato	34
2.2.16. Vías de transmisión.....	35
2.2.17. Patogenia.....	36
2.2.18. Inmunidad	38
2.2.19. Signos clínicos.....	39
2.2.20. Lesiones.....	41
2.2.21. Diagnóstico	42
2.2.22. Diagnóstico epidemiológico y clínico.....	43
2.2.23. Diagnóstico serológico	44
2.2.24. Pruebas serológicas.....	44
2.2.25. Diagnóstico no serológico	46
2.2.26. Examen histopatológico	47
2.2.27. Tratamiento	48
2.2.28. Control y prevención	49
2.2.29. Control de la transmisión vertical	49
2.2.30. Control de la transmisión horizontal	50
2.2.31. Prevención y vacunación	51

2.2.32. Zoonosis	53
2.2.33. Factores epidemiológicos	54
2.4. Definición de términos.....	55

**CAPÍTULO III:
MARCO METODOLÓGICO**

3.1. Tipo de investigación.....	58
3.2. Ámbito de investigación.....	58
3.3. Población y muestra	59
3.3.1. Población de animales	60
3.3.2. Tamaño de la muestra	61
3.4. Operacionalización de las variables	64
3.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos	64
3.5.1. Obtención de muestra	65
3.5.2. Procedimiento utilizado	65
3.5.3. Determinación toma de muestra sanguínea.....	65
3.5.4. Métodos y procedimiento	67
3.5.4.1. Prueba de IFI.....	67
3.5.4.2. Prueba de ELISA.....	68
3.5.5. Procedimiento	69

3.5.6. Materiales e instrumentos	70
3.5.6.1. Materiales de apoyo	70
3.5.6.2. Materiales instrumentos de campo.....	70
3.5.6.3. Materiales instrumentos de laboratorio	71
3.5.7. Dilución de ELISA	73
3.5.8. Dilución Prueba de IFI.....	74
3.5.9. Condiciones de conservación e eliminación de la muestra	75
3.5.10. Cálculo y expresión de resultados.....	76
3.5.11. Interpretación de resultados.....	76
3.5.12. Reactivos prueba de IFI	77
3.5.13. Reactivos prueba de ELISA	78
3.6. Análisis estadístico	78
3.6.1. Para los objetivos 1 y 3	78
3.6.2. Para el objetivo 2.....	79

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Distribución de la muestra según cuencas lecheras por categorías 2014.....	80
Tabla 3. Población de ganado vacuno raza holstein por categorías, según cuencas lecheras de la región Tacna, 2014.....	85
4.2. Comportamiento epidemiológico de la neosporosis bovina por cuencas Lechera	83
Tabla 4. Seroprevalencia de Neospora caninum en el ganado vacuno de las cuencas lecheras de Tacna 2014.....	88
Tabla 5. Seroprevalencia de neospora por categorías según la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en las cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	84
Tabla 6. Seroprevalencia de neosporosis por categoría bovina según la prueba inmunoenzimático ligada a enzimas indirecta (ELISA) en las cuencas lecheras de Tacna, 2014	86

Tabla 7. Comparativo de resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas indirecta (ELISA) por categorías en bovinos holstein de las cuencas lecheras de Tacna, 2014	88
Tabla 8. Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa).....	90
Tabla 9. Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de la cuenca lechera de Ite, 2014.....	92
Tabla 10. Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de la cuenca lechera de Locumba, 2014	94

Tabla 11.

4.3. Parámetros de valoración de las pruebas diagnóstica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba inmunoenzimático ligada a enzimas (ELIZA) para la detección de anticuerpos contra la Neospora caninum en bovinos holstein.....	96
De la prueba de IFI	
4.3.1. De la sensibilidad de la prueba de IFI.....	97
4.3.2. De la especificidad de la prueba de ELISA.....	98
4.3.3. Del valor predictivo positivo de la prueba de IFI.....	99
4.3.4. Del valor predictivo negativo de la prueba de IFI.....	100

Tabla 12.

De la prueba de ELISA

4.3.5. De la sensibilidad de la prueba de ELISA.....	102
4.3.6. De la especificidad de la prueba de ELISA.....	103
4.3.7. Del valor predictivo positivo de la prueba de ELISA.....	104
4.3.8. Del valor predictivo negativo de la prueba de ELISA.....	105
4.3.9. De las razones de verosimilitud.....	106

Tabla 13 Sensibilidad especificidad para la prueba de inmunofluorescencia.....	106
--	-----

Tabla 14	Sensibilidad especificidad de la prueba ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas	107
Tabla 15	Intervalos de confianza de la sensibilidad y especificidad para la prueba de IFI.....	108
Tabla 16	Intervalos de confianza de la sensibilidad especificidad para la prueba de ELISA.....	109
4.4. Percepción de los ganaderos respecto a la neosporosis y sus consecuencias.		
Tabla 17.	Prevalencia de aborto en vaquillonas y vacas de la raza Holstein en Cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	111
Tabla 18.	Posible vía de transmisión de la <i>Neospora caninum</i> en bovinos de la Raza holstein según percepción de los productores de las cuencas lecheras de Tacna, 2014	113
Tabla 19.	Destino de la placenta de vacunos de la raza holstein en las cuencas Lecheras de Tacna, 2014	114
Tabla 20.	Aborto según tercio en vaquillonas y vacas de la raza Holstein de las Cuencas lecheras de Ite, Sama y Locumba, 2014.....	116

Tabla 21. Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según conocimiento de la existencia de la Neospora Caninum como causa de aborto, 2014.....	118
Tabla 22. Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según si realizan buenas prácticas sanitarias para prevenir la transmisión de la Neospora Caninum, 2014.....	120
4.5. Contrastación de la hipótesis.....	122

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1. Describir el comportamiento epidemiológico de la neosporosis bovina por cuencas lecheras según categorías	123
5.2. Determinar los parámetros de valoración de las pruebas diagnóstica de inmunofluorescencia indirecta y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas para la detección de anticuerpos contra la <i>Neospora caninum</i>	127
5.3. Identificar la percepción de los ganaderos respecto a la neosporosis y sus consecuencias	129
5.3.1. De la presencia del aborto.....	129
5.3.2. Posibles vías de transmisión	130
5.3.3. Destino de la placenta.....	131
5.3.4. Presentación del aborto.....	132
5.3.5. Nivel de conocimiento de la <i>Neospora caninum</i>	133
5.3.6. Realizan buenas prácticas sanitarias	134
CONCLUSIONES	135
RECOMENDACIONES.....	138
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
ANEXOS	150

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Distribución de la población de bovinos.....	60
Tabla2.	Distribución de la muestra de estudio.....	63
Tabla 3.	Población de ganado vacuno raza holstein por categorías, según cuencas lecheras de la región Tacna, 2014.....	80
Tabla 4.	Seroprevalencia de <i>Neospora caninum</i> en la ganado vacuno de las cuencas lecheras de Tacna, 2014	83
Tabla 5.	Seroprevalencia de neosporosis por categoría bovina según la Prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI) en las cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	84
Tabla 6.	Seroprevalencia de neosporosis por categoría bovina según la Prueba ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (ELISA), en las cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	86

Tabla 7.	Comparativo de resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de las cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	88
Tabla 8.	Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de la cuenca lechera de Sama, 2014.....	90
Tabla 9.	Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de la cuenca lechera de Ite, 2014	92
Tabla 10.	Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de la cuenca lechera de Locumba, 2014	94

Tabla 11. Parámetros de valoración de las pruebas diagnóstica de Ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (ELISA) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra la Neospora caninum en bovinos holstein.....	96
De la prueba de IFI.	
4.3.1 De la sensibilidad de la prueba de IFI	97
4.3.2 De la especificidad de la prueba de IFI	98
4.3.3 Del valor predictivo positivo de la prueba de IFI	99
4.3.4 Del valor predictivo negativo de la prueba de IFI	100

Tabla 12

De la prueba de ELISA.	
4.3.5 De la sensibilidad de la prueba de ELISA	102
4.3.6 De la especificidad de la prueba de ELISA	103
4.3.7 Del valor predictivo positivo de la prueba de ELISA	104
4.3.8 Del valor predictivo negativo de la prueba de ELISA	105
4.3.9 De las razones de verosimilitud.....	112

Tabla 13	Sensibilidad especificidad para la prueba de inmunofluorescencia	106
Tabla 14	Sensibilidad especificidad de la prueba ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas	107
Tabla 15	Intervalos de confianza de la sensibilidad y especificidad para la prueba de IFI	108
Tabla 16	Intervalos de confianza de la sensibilidad especificidad para la prueba de ELISA	109
4.4	Percepción de los ganaderos respecto a la neosporosis y sus consecuencias.....	111
Tabla 17.	Prevalencia de aborto en vaquillonas y vacas de la raza Holstein en Cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	111
Tabla 18.	Posible vía de transmisión de la Neospora caninum en bovinos de la Raza holstein según percepción de los productores de las cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	113
Tabla 19.	Destino de la placenta de vacunos de la raza holstein en las cuencas Lecheras de Tacna, 2014	114

Tabla 20.	Aborto según tercio en vaquillonas y vacas de la raza holstein de las Cuencas lecheras de Ite, Sama y Locumba, 2014	116
Tabla 21.	Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según conocimiento de la existencia de la Neospora Caninum como causa de aborto, 2014.....	118
Tabla 22.	Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según si realizan buenas prácticas sanitarias para prevenir la transmisión de la Neospora Caninum, 2014	120
Tabla 23.	Contrastación de hipótesis- curva Roc	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Hospedero definitivo de la Neospora caninum.....	28
Figura 2.	Ciclo evolutivo de la Neospora caninum	29
Figura 3.	Población de ganado vacuno raza Holstein por categorías, según cuencas lecheras de la Región Tacna, 2014.....	81
Figura 4.	Seroprevalencia de Neospora caninum en el ganado vacuno de las cuencas lecheras de Tacna 2014	83
Figura 5.	Seroprevalencia de neosporosis por categoría bovina según la prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI), en las cuencas lecheras de Tacna ,2014.....	85
Figura 6.	Seroprevalencia de neosporosis por categoría bovina según la prueba ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (ELISA) en las cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	87

Figura 7.	Comparativo de resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de las cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	89
Figura 8.	Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de la cuenca lechera de Sama, 2014.....	91
Figura 9.	Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de la cuenca lechera de Ite, 2014	93
Figura 10.	Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos holstein de la cuenca lechera de Locumba, 2014	95

Figura 11. Prevalencia de aborto en vaquillonas y vacas de la raza holstein en cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	112
Figura 12. Posible vía de transmisión de la Neospora caninum en bovinos de la raza holstein según percepción de los productores de las cuencas lecheras de Tacna, 2014.....	113
Figura 13. Destino de la placenta de vacunos de la raza holstein en las cuencas lecheras de Tacna, 2014	115
Figura 14. Aborto según tercio en vaquillonas y vacas de las cuencas lecheras de Ite, Sama y Locumba, 2014	117
Figura 15. Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según conocimiento de la existencia de la Neospora Caninum como causa de aborto, 2014.....	119
Figura 16. Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según si realizan buenas prácticas sanitarias para prevenir la transmisión de la Neospora caninum, 2014.....	120

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1:	Microscópico de inmunofluorescencia. Para identificar taquizoítos de <i>Neospora caninum</i>	160
Anexo 2:	Lectora Espectrofotómetro.....	160
Anexo 3:	Micro placas – prueba de ELISA.....	160
Anexo 4:	Reactivos prueba de ELISA	161
Anexo 5:	Reactivos prueba de IFI.....	161

RESUMEN

Para el presente estudio se ha utilizado dos pruebas serológicas como la prueba de inmunofluorescencia indirecta y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas indirecta. Para el análisis estadístico se empleó paquete SPSS versión 21. La seroprevalencia de la *Neospora caninum* en el ganado vacuno de la raza hosltein, de la cuenca lechera de Tacna de 179 animales muestreados 49 resultaron positivos representa 27,37 % a la prueba de IFI, 44 resultaron positivos (ELISA) con 24,58 %. La Neosporosis por categorías en vaquillas y vaquillonas 14 resultaron positivos y 59 en vacas (IFI), Prueba de ELISA, 14 vaquillas y vaquillonas resultaron positivo y 80 vacas resultaron positivos. La percepción de los ganaderos, en cuanto al aborto un 56 % seroprevalencia en vaquillonas y 50,46% en vacas, vía de transmisión vertical con una seroprevalencia 60,34 % y 39,66 % la vía horizontal, destino de la placenta en caso que entierran una seroprevalencia 53,10 %, en caso que ignoran 16,80 %, para el tercer tercio de gestación se obtuvo una seroprevalencia 44 % en vaquillonas y 39,06 % en vacas, en cuanto al nivel de conocimiento una seroprevalencia 65,92 %, si realizan prácticas sanitarias una seroprevalencia 63,69 %.

Palabras clave: seroprevalencia, sensibilidad, especificidad, IFI, Elisa, *Neospora caninum*, bovinos

ABSTRACT

For the present study we used two serological tests such as indirect immunofluorescence and enzyme immunoassay test indirectly linked to enzymes. For statistical analysis package SPSS version 21 was used seroprevalence of *Neospora caninum* in cattle in the race Holsteins, dairy basin of Tacna 49 of 179 sampled tested positive animals represents 27.37% of the IFAT, 44 were positive (ELISA) with 24.58%. The Neosporosis by categories in heifers and heifers 14 were positive and 59 cows (IFI), ELISA test, 14 heifers and heifers cows were positive and 80 tested positive. The perception of farmers, on abortion in 56% seroprevalence 50.46% heifers and cows, vertical transmission via seroprevalence 60.34% and 39, 66% horizontal route, destination if the placenta Burying 53.10% seroprevalence if they ignore 16.80% for the last third of gestation seroprevalence was obtained in 44% 39.06% heifers and cows, in the level of knowledge seroprevalence 65, 92% if made sanitary practices seroprevalence 63.69%.

Keywords: seroprevalence / sensitivity / specificity / IFI / Elisa / *Neospora caninum* / cattle

RESUMO

Para o presente estudo foram utilizados dois testes sorológicos, como a imunofluorescência indireta e teste imunoenzimático indirectamente ligados a enzimas. Para o pacote estatístico SPSS versão análise 21 foi usado soroprevalência de Neospora caninum em bovinos nas Holsteins raça, bacia leiteira de Tacna 49 de 179 amostrados animais positivos testados representa 27,37% da IFAT, 44 foram positivos (ELISA), com 24,58%. A neosporose por categorias em novilhas e bezerras 14 foram positivas e 59 vacas (IFI), teste de ELISA, 14 novilhas e vacas novilhas foram positivas e 80 deram positivo. A percepção dos agricultores, sobre o aborto em 56% de soroprevalência 50,46% de novilhas e vacas, via transmissão vertical soroprevalência 60,34% e 39, 66% rota horizontal, destino, se a placenta Enterrar 53,10% soroprevalência se ignorarem 16,80% para o último terço da gestação soroprevalência foi obtida em 44% 39.06% novilhas e vacas, no nível de conhecimento soroprevalência 65, 92% se as práticas sanitárias feitas Soroprevalência 63,69%.

Palavras-chave: prevalência, sensibilidade, especificidade, IFI, Elisa, caninum, bovina

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la ganadería bovina afronta grandes problemas reproductivos, a nivel regional, nacional y mundial, especialmente en el transcurso de la gestación, ya que muchos agentes patógenos producen abortos, reabsorción embrionaria, momificación fetal. Los principales patógenos que interrumpen la gestación normal de las vacas son la *Neospora*, *Brucella abortus*, *Leptospira interrogans* el *Togavirus* que causa la diarrea viral bovina (BVD). La mayoría de estas enfermedades reproductivas son causales por un mal manejo reproductivo, incumplimiento de vacunas y control sanitario, y en otros casos se observa un escaso seguimiento clínico durante la gestación bovina.

Asimismo, los efectos que ocasionan estas enfermedades reproductivas durante la gestación bovina son visibles como el aborto que conlleva a la pérdida de una cría, disminución de los periodos de lactancia y lento crecimiento del hato ganadero, lo que deviene en un déficit en el ingreso económico en la explotación ganadera e incremento de los costos de producción.

Cabe mencionar que la enfermedad causada por la *Neospora*

caninum, ocasiona pérdidas económicas por la pérdida de la cría y por consiguiente de la producción de leche en el ganado vacuno. Es así, que a nivel mundial se ha estimado que las pérdidas económicas por esta enfermedad, oscilan entre el 12 y 42 %.

Mientras que en el presente estudio de investigación, se ha estimado con los resultados obtenidos para la prueba IFI (resultados positivos), los siguientes valores de pérdidas económicas en nuevos soles por categorías de la cuenca lechera de Tacna de la *Neospora caninum* es de, S/. 65,52 (vaquillas), S/. 112 (vaquillonas) y S/. 1161,30 (vacas); en tanto con la prueba de ELISA (resultados positivos) es de S/. 65,52 (vaquillas); S/. 112 (vaquillonas) y S/. 1 353,52 (vacas) animales, lo que evidencia un impacto en la economía de los criadores de ganado vacuno a nivel de la región Tacna.

De otro lado, mi experiencia profesional me ha conducido a observar de cerca la realidad de la neosporosis en bovinos de las cuencas lecheras de la región de Tacna, lo que sin duda, incrementa la morbilidad y la mortalidad neonatal, ocasionando pérdidas económicas en la crianza y explotación del ganado. Al parecer, muchos ganaderos desconocen la epidemiología de la enfermedad, las medidas preventivas y el control sanitario, lo que menoscaba la posibilidad del control de la enfermedad.

En tal sentido, el propósito del presente estudio tiene por finalidad determinar; en primer lugar, desde el punto de vista clínico, la sensibilidad, y especificidad, valores predictivos y la razón de verosimilitud de la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), habiéndose encontrados resultados similares, es decir se puede utilizar indistintamente cualquiera de las dos pruebas; en segundo término, demostrar la importancia de la enfermedad que tiene la neosporosis bovina actualmente, como causa de abortos de una explotación ganadera de leche y carne.

Estudios posteriores determinaron que el parásito denominado *Neospora* aislado en perros y bovinos pertenece a la misma especie, desde entonces «[...] se ha reconocido como causa importante de aborto en varios países [...]» no solo en bovinos sino también en cabras, ovejas, caballos, ciervos, camellos, búfalos y gatos.

Causante de abortos en las vacas entre el primer, segundo y tercer mes de gestación, por lo cual es de suma importancia dar a conocer esta enfermedad reproductiva a todos los ganaderos, médicos veterinarios, y juntamente, tratar de mejorar las medidas profilácticas y el manejo reproductivo para poder enfrentar esta enfermedad dentro de una

explotación ganadera.

El presente trabajo se estructura en cinco capítulos: el capítulo I trata del problema de investigación, describe el comportamiento de la epidemiología de la Neosporosis bovina; en el capítulo II se expone los antecedentes de la investigación, el estado del arte, la base teórica y la definición de términos; en el capítulo III, se aborda el marco metodológico, se explica la metodología, las técnicas y los procedimientos realizados en las pruebas serológicas, mientras que en el capítulo IV se exponen los resultados con la interpretación correspondiente en función a los objetivos del estudio. Finalmente en el capítulo V, se realizó la discusión de los hallazgos, en función de una comparación e interpretación contextual. Se consignaron, conclusiones, recomendaciones y referencias bibliográficas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Planteamiento del problema

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Neospora caninum*, denominado así, al ser aislado inicialmente de perros que sufren trastornos neuromusculares. El parásito cumple un ciclo que incluye al bovino como hospedador intermediario y al perro y otros cánidos, como hospedadores definitivos.

Se considera una de las principales causas de aborto en la especie bovina, especialmente en ganado lechero. Además del aborto la enfermedad ha sido asociada con la reducción en la producción de leche y carne, y así como, trastornos de fertilidad, causando pérdidas económicas. (1)

Es considerada como una de las principales causas de aborto y mortalidad neonatal en el ganado vacuno (16), se puede presentar en forma epidémica o endémica en un hato. (2)

La actividad serológica en el mundo revela valores tan altos como un 59,00% en Escocia (3) (1) y bajos como Suecia que reportó recientemente una prevalencia de 2 % (4).

Nuestro país es altamente seroprevalente, ya que alcanza valores del 43 % en Cajamarca (5), 57 % en Arequipa 30% en el valle de Lima (6) y 40 % en Amazonas (7) la zona norte del valle de Lima presenta una prevalencia de 42,08 %, mientras la zona sur presenta una prevalencia de 22 % (6).

A nivel regional, en el valle de Sama, gran parte del ganado vacuno proviene del distrito de Ite, habiéndose reportado una prevalencia del 50 % (8) (9) con una prevalencia de 47,82 % en el distrito de Inclán – Sama Tacna, (10) quien reporto una sero prevalencia de 44,30 % en el distrito de Ite – Tacna. Lo que podría indicar que estamos frente a un agente parasitario presumiblemente causal de abortos en el ganado vacuno, los que muchas veces no se diagnosticaron (11).

Otro de los problemas es el factor epidemiológico, animales de otros lugares con problemas de *Neospora caninum*, presencia de cánidos alrededor de los predios, edad, destino de fetos y placenta, podrían estar influyendo en la presentación de la enfermedad (8).

Ante lo expuesto, amerita indagar sobre la epidemiología de los bovinos *holstein* y establecer la detección de los anticuerpos contra la *Neospora caninum*.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es el comportamiento epidemiológico de la *Neosporosis bovina* y el valor predictivo de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (Elisa) indirecta para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos *holstein* por categorías en cuencas lecheras de la región Tacna?

1.2.2 Problemas específicos

¿Cuál es el comportamiento epidemiológico de la neosporosis bovina por cuencas lecheras según categoría?

¿Cuáles son los parámetros de valoración de las pruebas diagnóstica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos *Holstein*?

¿Cuál es la percepción de los ganaderos respecto a la neosporosis y sus consecuencias?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Identificar el comportamiento epidemiológico de la neosporosis bovina y la sensibilidad y especificidad de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas indirecta (ELISA), para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos *Holstein* según categorías.

1.3.2 Objetivos específicos

Describir el comportamiento epidemiológico de la neosporosis bovina por cuencas lecheras según categoría.

Determinar los parámetros de valoración de las pruebas diagnóstica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimática ligada a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos *Holstein*.

Identificar la percepción de los ganaderos respecto a la neosporosis y sus consecuencias.

1.4 Hipótesis

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) es más sensible y específica que la prueba de ensayo inmunoenzimática ligada a enzimas indirectas (ELISA) para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos *holstein*.

1.5 Justificación de la investigación

El estudio es relevante, porque incide en la calidad de vida de los productores de estas tres cuencas, donde sus actividades son exclusivamente orientadas a la crianza de ganado vacuno, debido a que la

enfermedad tiene un alto impacto económico en la ganadería como consecuencia de los abortos, cuyos mayores índices ocurren entre el tercer y sexto mes de gestación, lo que afecta la eficiencia reproductiva (12).

La neosporosis, considerada como una de las enfermedades parasitarias más importantes a escala regional, nacional y mundial; es un protozoo que ha adquirido gran importancia al estar implicado como uno de los principales patógenos causantes de aborto en el ganado vacuno, es importante recalcar el hecho de que no todas las vacas infectadas sufren aborto por esta causa, por lo que, se le confiere el carácter de enfermedad emergente (12).

La enfermedad no produce signos clínicos visibles en el ganado vacuno con excepción del aborto que fue reportado por primera vez en el año 1988 en Noruega por (13) como una encefalitis de los perros, lo que afectó a una amplia gama de mamíferos como los bovinos, ovinos, caprinos que actúan como huéspedes intermediarios, que se infectan al consumir agua y alimentos contaminados con ooquistes que se encuentra en las heces de perros infectados, mismos que actúan como huésped definitivo al ingerir fetos, placenta y carne de animales portadores(14).

Por lo tanto, se diseñó el presente estudio de investigación para determinar la comparación entre las pruebas de diagnóstico de

inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas indirectas (ELISA), para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos de la raza *holstein* en las cuencas lecheras de Sama, Ite y Locumba, a fin de proporcionar información para futuros estudios epidemiológicos relacionados a este parásito.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Se ha encontrado que los problemas reproductivos en ganado bovino producido por la *Neospora caninum* han sido reportados alrededor del mundo.

En España con una prevalencia de 30,6% al evaluar a 889 vacas lecheras provenientes de 43 hatos del norte del país, Suecia reportó recientemente una prevalencia de 2%, en el Reino Unido se han reportado prevalencias de 1,1% en Inglaterra (14), en Escocia y (3) en Dinamarca se encontró el parásito, mediante inmunohistoquímica, en dos fetos abortados de vacas Holstein – Friesian(15), Alemania presentó una prevalencia de 4,1% mediante inmunofluorescencia indirecta al evaluar 388 vacas provenientes de hatos con problemas reproductivos (2), Holanda mostró una prevalencia de 51,5% en un estudio donde se evaluaron 50 hatos lecheros (16), Francia realizó una encuesta serológica mediante una prueba de Elisa en 575 vacas de raza Holstein y 219 de raza

Charolais que tuvieron problemas de aborto y encontraron una prevalencia de 26% y 14% respectivamente (17). En Asia se logró aislar el parásito en 9 fetos y 2 terneros nacidos de vacas sospechosas de infección por *Neospora caninum* en Corea del Sur (Kim et al, 2000) y Taiwán reportó una prevalencia de 44.9% (18).

En el continente oceánico, se reportó en Australia una prevalencia de 24% (19).

En el continente americano tenemos que en los Estados Unidos de Norteamérica el *Neospora* es la mayor causa de aborto con prevalencias que van desde 21,7% a 38% (12). Canadá reportó una prevalencia de 21,9% (20)

En otros países de Sudamérica también se confirmó la presencia del parásito, reportándose prevalencias de 14,09% en Brasil, al evaluarse 447 sueros provenientes de vacas lecheras de la ciudad de bahía (21) y de 56,9% en Argentina (22) en ambos casos utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta.(23) Utilizando un kit comercial de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en la zona centro – norte de Ecuador, halló que el 42% de las muestras fueron positivas a la presencia de anticuerpos a *Neospora caninum*, el 2,8% fue sospechoso y el 55,2% resultó negativo. Dicho autor menciona que los

animales positivos habrían estado expuestos al parásito en algún momento de su vida y en muchos casos estarían relacionados directamente a la etiología de deficiencias reproductivas.

Resultados previos en otras zonas del país indican seroprevalencias de *Neospora caninum* de 43% en Cajamarca (24), 57% en Arequipa (25), 30% en el valle de Lima (6) y 40% en Amazonas (7).

En el trabajo realizado en el valle de Lima se evaluaron 304 sueros de vacas lecheras adultas de 19 establos lecheros ubicados en la zona sur del valle de Lima para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* mediante la prueba de *inmunofluorescencia* indirecta (IFI): El 29,61% presentó anticuerpos contra el parásito en una dilución de 1:200; en la zona norte el 40,83% y en la zona sur 22,28%, a su vez, se tiene que la totalidad de los establos evaluados presentaron al menos un animal seropositivo, lo cual estaría indicando que los animales se encuentran expuestos a una fuente de infección no determinada, (6) Se estableció la seroprevalencia de *Neospora caninum* en vacunos lecheros criados al pastoreo de la provincia de Melgar (Puno), mediante la detección de anticuerpos séricos por la técnica de *inmunofluorescencia* indirecta (IFI). Se evaluó 419 sueros obtenidos en forma aleatoria de siete fundos ganaderos donde las prevalencias obtenidas variaron desde 4,0%

hasta 37,5%, la prevalencia general fue considerada moderada 18,1%. Todos los fundos presentaron al menos un animal seropositivo (27).

Se hallaron en la estación experimental IVITA Pucallpa donde la Neosporosis no está al parecer muy difundida en el hato, pues solo el 1,5% de los bovinos adultos presentaron anticuerpos contra el protozoo *Neospora caninum* en el hato en estudio podría ser debido a la nula introducción de animales positivos o la ausencia de perros infectados. En comparación con el estudio realizado en la provincia de Chachapoyas (zona de selva alta) se menciona una prevalencia del 40,4%. Esta diferencia puede deberse a que allí hubo introducción de animales principalmente de Cajamarca, donde se reporta una prevalencia superior al 50% (5).

Estudios realizados en 8 fundos de la campiña de Cajamarca, confirmaron la transmisión vertical del parásito, mediante el suero de vacas y sus crías, Se evaluaron 152 muestras correspondientes a 76 vacas y sus respectivas crías, estas últimas fueron muestreadas al nacimiento antes de ingerir el calostro. Los resultados mostraron una prevalencia a anticuerpos con *Neospora caninum* en el 40,8% y 22,4% de las vacas y crías muestreadas respectivamente, así mismo se determinó un porcentaje de transmisión vertical de 54,8% (28). durante un estudio

realizado en vacunos de la provincia de Chota en el departamento de Cajamarca, se evaluó 174 sueros de vacunos hembras mediante la técnica de Elisa (Herdcheck – Anti – Neosporaldex USA), empleando la dilución de 1:100 según indicaciones del fabricante, el estudio determinó una prevalencia total de 39,08% mientras que las prevalencias para los grupos etarios de vacas, vaquillonas y ternaras fue de 44,6%, 34,3% y 31,2% respectivamente, el estudio determinó que aun cuando la prevalencia se incrementaba a medida que aumentaba la edad de los animales (29).

En el departamento de Junín se determinó la prevalencia de *Neospora caninum* en vacas de la empresa de Sociedad Agrícola de Interés Social (SAIS) Pachacutec, en el año 2003 se evaluaron 347 muestras de suero, recolectadas de vacas Brown Swiss adultas, mediante la prueba de inmufluorescencia indirecta (IFI) el 12,4% de los animales presentaron anticuerpos contra el parásito 13,2%. Se observó una frecuencia mínima de 2,5% y una máxima de 19,6% en los siete hatos evaluados, sin encontrar diferencia estadística significativa.

Se reportó la prevalencia de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos de dos distritos de la provincia de Chachapoyas, fue de 40,4% (7).

Reportes encontrados en la publicación de (12) donde realizó análisis de muestras de 104 vacas, procedentes de 14 establos lecheros de Arequipa, los resultados mostraron una prevalencia a *Neospora caninum* de 57 %, todos los establos presentaron al menos un animal seropositivo, mediante la prueba de inmunofluorescencia.

Se determinó la seroprevalencia de *Neospora caninum* en el valle de Moquegua, distrito de Moquegua provincia de Mariscal Nieto, donde se evaluaron 157 vacas, según edad en vacas de 2 a 3 años 50,09% de casos positivos, de 4 a 6 años con 61, 40% resultaron positivos, de 7 a 9 años 37,78%, más de 10 años 18,18%, la presencia de perros en los hatos lecheros se muestran así: hatos sin perros 12,5% con 1 – 2 perros y más de 5 perros 6,25% dejan a la intemperie de seropositividad (30).

En el ámbito regional se reportó una seroprevalencia del 28% en el sector Sama Grande del distrito de Sama – Inclán. Se evaluaron 115 muestras sanguíneas de bovinos lecheros distribuidos por edad (2 a 4,5 < 4,5 a 7 y < 7 a 10 años) y por lugar de procedencia (Arequipa, Ite, Sama y la yarada). A través de la prueba de IFI se determinó una seroprevalencia a *Neospora caninum* la cual resultó ser moderada y con un valor de 28,70%, considerando la edad de los animales, se observó que los animales de <7 a 10 años presentaron los valores más elevados

de seroprevalencia 44,4%, luego los animales de 2 a 4.5 años presentaron 27,87% y finalmente los animales de <4,5 a 7 años 26,67% respectivamente. De otro lado la seroprevalencia del parásito considerando la procedencia fue de 30% para Sama y ausente en la Yarada, en conclusión la edad y la procedencia de los animales son posibles factores de riesgo, estos no resultaron estadísticamente significativos. Por lo tanto, la edad y la procedencia no representan factores que influyen o condicionan la presencia de la enfermedad (8). Resultados encontrados por (9) con una prevalencia de 47.82% en el distrito de Inclan – Sama región Tacna. (10) quien reportó una seroprevalencia de 44,3% en el distrito de Ite – Tacna.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Base filosófica y epistemológica

Conviene precisar la etimología de la palabra epidemiología proviene de los términos epi, encima demos (pueblo) y logos (estudio) etimológicamente significa el estudio de lo que está sobre las poblaciones. La larga historia de epidemias infecciosas que azotaron al mundo antiguo y medieval fue determinando una identificación casi natural entre los conceptos de epidemia, infección y contagio, que según Winslow, la

aparición de la pandemia de peste bubónica o peste negra que azotó a Europa durante el siglo XIV.

En tal sentido, el propósito principal de la investigación epidemiológica debe ser la explicación de la distribución desigual de las enfermedades entre las diversas clases de animales, en donde se encuentra la determinación de la salud enfermedad. No obstante, el interés que revisten estos planteamientos, el limitado desarrollo de instrumentos conceptuales adecuados para contrastar sus hipótesis, ha impedido que este modelo progrese como una alternativa real a los modelos de la red de casualidad y de la caja negra. En la actualidad, la epidemiología enfrenta varios problemas metodológicos, de los cuales, quizás el más importante es el problema de la causalidad, aspecto sobre el que todavía no existe consenso entre los expertos, el abanico de posturas se extiende desde los que proponen el uso generalizado de los postulados de causalidad, hasta los que consideran que la epidemiología debe abandonar el concepto de causa y limitarse a dar explicación no determinante de los eventos que investiga. Otro de los problemas filosóficos de la epidemiología contemporánea se refiere a la índole de su objeto de estudio, en este campo, los esfuerzos por determinar la naturaleza de los eventos epidemiológicos también han desembocado en la formación de diversas corrientes, que debaten intensamente si este

objeto se alcanza con la de diversas corrientes, con el análisis poblacional o mediante la investigación de lo social, han proliferado los intentos por desentrañar cada vez con mayor riesgo

La epistemología, utiliza una explicación inductiva que genera conocimiento científico, en nuestro caso particular, desde la investigación realizada sobre neosporosis enfermedad que produce aborto en bovinos en general. Conviene citar a (14), quien postula que la epistemología no es la ciencia que estudia cómo se produce el conocimiento, sino que es del conocimiento producido y esto está representado por el conocimiento objetivo (estudios teóricos, problemas científicos, procesos de contratación, conceptos, hipótesis y principalmente los argumentos científicos). En este contexto, los resultados científicos sobre la neosporosis bovina son abundantes, lo que permite enfrentar y resolver el problema en este caso el aborto de fetos en bovinos. En relación al conocimiento sobre neosporosis bovina, es importante estudiar la capacidad de las diferentes pruebas diagnósticas para discriminar a los sujetos de estudio como positivos o negativos, teniendo como referente un Gold estándar, para obtener nuevo conocimiento en este campo de la validación de pruebas de utilidad para diseñar y aplicar políticas de salud animal, en este caso que deben resolver a corto y mediano plazo el

problema de la neosporosis en bovinos, habiendo sido demostrada su verosimilitud o grado de verdad.

El objetivo del presente trabajo fue establecer y demostrar que los principios epistemológicos en la investigación aplicada en salud, permiten una explicación inductiva para generar conocimiento científico a partir de las investigaciones de la neosporosis en bovinos de gran altitud, y permiten obtener estrategias para el control de esta enfermedad prioritaria en la salud pública.

En el contexto actual de las ciencias, y en particular de las ciencias sociales, se hace necesario reflexionar desde otras perspectivas epistemológicas sobre la forma como hemos venido estudiando, investigando y comprendiendo la salud pública, a fin de pulir nuestra conciencia sobre los retos y soluciones que esta compleja realidad nos exige.

Si bien las ciencias y los procesos de investigación que guardan estrecha relación con la salud pública tienen una venerable historia, de notable desarrollo, también lo es que estos logros han ocurrido principalmente en el contexto del paradigma de las ciencias clásicas. Al penetrar en los fenómenos sociales, en los cuales la vida se constituye de hechos en sus aspectos diferenciados fundamentalmente, hace lo que el

éxito del paradigma de investigación disminuya, pues si bien ha funcionado adecuadamente en ciertos campos como demográficos, epidemiológicos y clínicos, entre otros. No cabe duda que dicha restricción se ha intentado superar a través de la perspectiva sistémica, sin embargo, en aquellos campos en los que ha tenido éxito cae en su propia trampa por la necesidad ineludible de usar sistemas formales para su descripción.

La epidemiología en la salud pública que tiene como propósito describir y explicar la dinámica de la salud, identificar los elementos que la componen y comprenden las fuerzas que la gobiernan, a fin de intervenir en el curso de su desarrollo natural. Investiga la distribución, frecuencia y determinantes de las condiciones de salud, así como las modalidades y el impacto de las respuestas sociales instauradas para atenderlas.

Podemos concluir que la transformación de la epidemiología en una ciencia ha tomado varios siglos, y puede decirse que es una ciencia joven y se ha estado modificando radicalmente desde su origen hasta la actualidad. Se encuentra en proceso de revisión permanente lo que hace a la epidemiología una descriptiva viva y en constante movimiento, es por eso que se espera que en las próximas décadas hayamos de ver a la disciplina convertida en una ciencia de vastos alcances.

A modo de colofón citamos (15), quien afirma que el conocimiento es como el mar: No hay ningún mar en sí, sólo se denomina así a aquél lugar situado a un nivel inferior donde se acumulan las aguas. Si en los ríos corre agua suficiente y si existe un campo gravitatorio, los ríos tienen que ir a parar al mar. El campo de gravedad equivale a la actitud social que proporciona la dirección y el agua al trabajo conjunto del colectivo de pensamiento.

2.2.2. *Neospora caninum*

El primer reporte de infección producida por *Neospora caninum*, protozoo de aspecto similar al *Toxoplasma gondii*, fue realizado en Noruega por observaciones a una camada de perros con diagnóstico de encefalopatía mortal (13). Posteriormente, en Estados Unidos se aisló un parásito similar en perros con alteraciones neurológicas. Después de varios estudios, se logró identificar y describir a este nuevo parásito con características diferentes a las del *Toxoplasma gondii* y se le denominó *Neospora caninum* (1).

Neospora caninum se incluye dentro del phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y familia Sarcocystidae, junto con los géneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* y *Besnoitia*(1). Se ha incluido dentro del género *Neospora* a

una especie que ha sido encontrada en caballos y presenta diferencias moleculares con *Neospora caninum*. Esta nueva especie se denomina *Neospora hughesi*.

Clasificación

De acuerdo al ciclo de vida: Es heterogéneo ya que parasita tanto al perro como a los vacunos, ovinos y caprinos.

De acuerdo al rango del hospedero: Es eurígeno ya que parasita tanto al perro como a vacunos, ovinos y caprinos.

De acuerdo al tipo de reproducción: Es heterogéneo ya que realiza un ciclo de reproducción asexual en el huésped intermediario y un ciclo sexual en el huésped definitivo.

2.2.3. Ciclo biológico

Se determinó que el perro es el hospedero definitivo de este parásito y son ellos los que diseminan al medio ambiente los ooquistes no esporulados (32). Estos ooquistes se hacen infectivos al esporular en el medio ambiente a las 24 horas. Los ooquistes esporulados al ser ingeridos por algún animal hospedero llegan al tracto intestinal liberando los esporozoítos y estos penetran en las células entéricas transformándose en taquizoítos (33).

Estos taquizoítos son viables a 4°C por 14 días, pero no resisten temperatura de congelación, penetran en las células hospederas por invasión activa localizándose en el citoplasma, dentro de una vacuola parasitófora, la cual se puede apreciar en número variado dentro de una misma célula hospedera (1). Estos taquizoítos se dividen rápidamente por endodiogenia y suelen agruparse formando quistes tisulares de forma redondeada a oval. Se pueden apreciar con mayor frecuencia en el tejido nervioso, luego pueden transformarse en bradizoítos. Se sugiere que solo los bradizoítos pueden inducir la excreción de ooquistes en el perro (33) estos bradizoítos son resistentes a la solución de HCl – Pepsina (1).

El perro consume tejidos de animales infectados con *Neospora caninum*, desarrollando a nivel intestinal la fase sexual del parásito, lo cual conlleva a la eliminación del ooquiste al medio ambiente, mezclados con las excretas. Los ooquistes esporulan en un periodo de 1 a 3 días y son consumidos, mezclados con los alimentos y el agua de bebida, por los hospederos intermediarios (bovinos, ovinos, caprinos y camélidos).

En el hospedero intermediario es donde se desarrolla la fase asexual del parásito, con la liberación de esporozoitos, que luego penetran a las células entéricas transformándose en taquizoítos (replicación rápida), que son diseminados en diversas células (células

nerviosas, hepáticas, miocitos, fibroblastos, células epiteliales de los túbulos renales y placenta). Posterior a la diseminación de los taquizoítos se realiza la formación de los bradizoítos (replicación lenta) los cuales son enquistados en los denominados “quistes tisulares” localizados principalmente en el tejido nervioso. Siendo la ingestión de quistes tisulares el reinicio al ciclo en el hospedero definitivo (32).

2.2.4 Fases evolutivas

Taquizoitos

Los taquizoítos se dividen por endodiogénesis en forma rápida. Miden aproximadamente de 3 - 7 μm de longitud, tiene entre 6 -16 roptries y en algunos casos presentan entre 4 - 6 roptries localizados en la parte posterior del núcleo, raramente se observa un micro poro. Son de forma ovoide, semilunar o globosa (31).

Es uno de los tres estados infecciosos de *Neospora caninum* y se encuentra en el hospedero intermediario, en forma intracelular, generalmente a nivel citoplasmático, específicamente, en la vacuola parasitófaga de la célula hospedador. Puede parasitar a un gran número de células como neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, hepatocitos (1).

Bradizoítos

Los bradizoítos se dividen por endodiogénesis, en forma lenta, encontrándose dentro de los quistes tisulares. Miden aproximadamente 7-8 μm , contiene los mismos organelos que el taquizoito, presentan un número menor de roptries. Morfológicamente son similares a los taquizoitos (31).

Quistes

Es un estado que se encuentra en el hospedero intermediario. Los quistes en el tejido son ovalados o redondos y miden hasta 107 μm de diámetro y se encuentran primariamente en el sistema nervioso central, dentro de los quistes encontramos los bradizoítos, aproximadamente miden de 50-500 μm . Su pared es lisa y gruesa (4 μm) (31).

Ooquistes

No esporulados: Son los eliminados en las heces del hospedador definitivo son esféricos o subesféricos, miden 10 a 11 μm (34)

Esporulados: Los ooquistes esporulados son los que después de tres días en el medio ambiente contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno, son morfológicamente similares a los ooquistes de *Toxoplasma gondii* y *Hammondia* en el perro (31).

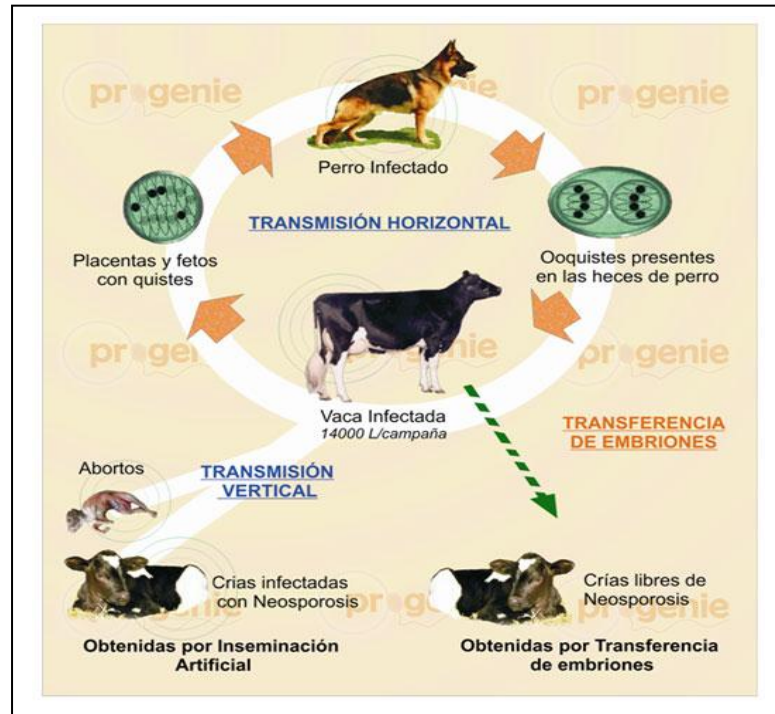


Figura 1 Hospedero definitivo de la *Neospora caninum*

Fuente <https://www.engormix.com/MA-ganaderia>

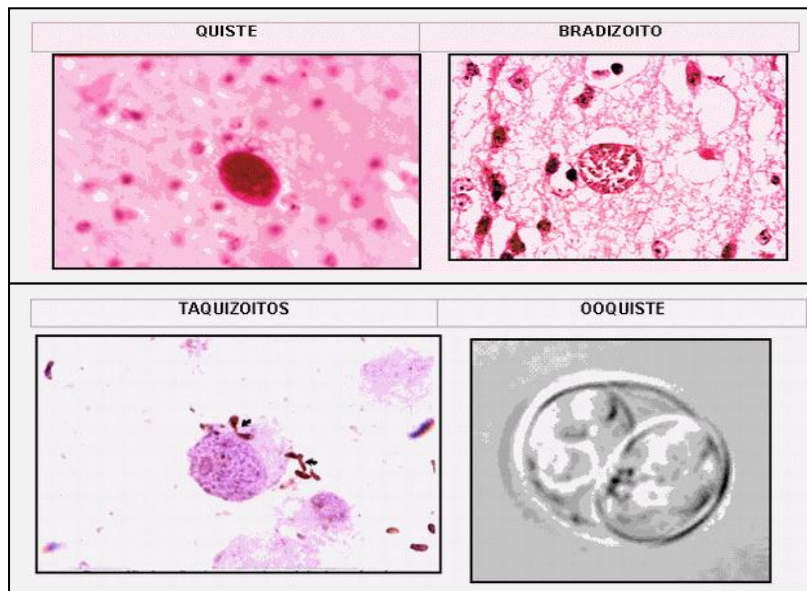


Figura 2 Ciclo evolutivo de la *Neospora caninum*

Fuente <https://www.engormix.com/MA-ganaderia>

2.2.5 Epidemiología

El *Neospora caninum* fue reconocido como causante de problemas nerviosos en caninos, posteriormente se relaciona por primera vez con un cuadro de aborto bovino en un establo lechero de Nuevo México (1). Desde entonces se ha comprobado que este protozoo afecta a diferentes especies animales como cabras, ovejas, yeguas, ratones, ciervos (1), búfalo de agua, coyote, zorro rojo y camellos, de manera experimental a gatos, jerbos (1) primates no humanos (15) y cerdos (35) Los problemas

de abortos asociados a infección por *Neospora caninum* e infecciones congénitas han sido reportados en bovinos de leche y carne (12).

2.2.6 El parásito

El *Neospora caninum* es un protozooario que podría haber sido confundido en reiteradas ocasiones por su similitud con *Toxoplasma gondii* (13). Siendo estos dos géneros diferentes y antigénicamente distintos.

Este protozooario es el causante de abortos y morbilidad neonatal en vacunos. La adquisición de infección congénita puede persistir en terneras o vaquillas clínicamente sanas, pero portadoras de por vida de la neosporosis pudiendo transmitirse la infección transplacentariamente de generación en generación a su descendencia aun sin la presencia del hospedero definitivo (12).

2.2.7 Hospedero

Se ha demostrado que el perro es el hospedero definitivo del parásito (33) pudiéndose convertir así en un diseminador de la infección tanto en el ganado vacuno como en otras especies mediante la dispersión de los ooquistes sin esporular, también se ha comprobado que la seroprevalencia para neosporosis tiende a ser mayor en explotaciones

donde el hospedero definitivo convive con el ganado vacuno(36) lo que estaría indicando la importancia del rol de los perros en la diseminación de la neosporosis en el ganado vacuno (16).

2.2.8 Medio Ambiente

Los ooquistes son la fase biológica del *Neospora caninum* directamente influenciado por el medio ambiente. Estos salen a través de las heces de los perros y esporulan en el medio ambiente 24 horas después de haber sido eliminados, en ese momento presentan dos esporoquistes cada uno con cuatro esporozoitos. Los ooquistes en las heces del perro contaminan los campos de pastoreo, la comida almacenada y el agua que consumen los bovinos, en este momento la transmisión de la infección vía oral dependerá de la viabilidad de los ooquistes en el medio ambiente. En este caso la infección de los animales en zonas templadas y los abortos por esta causa sería más frecuente durante las estaciones de otoño-invierno ya que probablemente la viabilidad de los ooquistes en el medio disminuiría notablemente durante la estación seca y cálida (37).

2.2.9 Factores de riesgo

Presencia del hospedero definitivo

El perro y coyote por ser hospederos definitivos del *Neospora caninum* (32) (33) (21) representan gran importancia en la transmisión horizontal de la infección. Por ello se indica que existe asociación entre la presentación de *Neospora caninum* en hatos con problemas de aborto y la presencia de perros. Asimismo se menciona que un perro puede eliminar más de 500,000 ooquistes después del consumo de tejido infectado pudiendo infectar potencialmente a cientos o miles de vacas (31)

2.2.10 Sexo

Las hembras son más importantes en cuanto el mantenimiento en el hato de la neosporosis, debido a que los estudios realizados demuestran que la infección por *Neospora caninum* es más frecuente en rebaños de aptitud lechera que los de aptitud cárnica (38) (1).

2.2.11.1 Edad de la madre

Estudios realizados en novillas y vacas, muestran que existe mayor repercusión en novillas, ante la infección por *Neospora. Caninum* (39). En base a esto, se menciona que la magnitud de infección por *Neospora caninum* es más evidente en novillas y decrece con el número de partos,

lo que sugiere que la inmunidad protectora materna incrementa con la edad (39). Sin embargo, también se menciona que el riesgo de volverse seropositiva puede incrementar con la edad o el número de gestaciones tanto en ganado de carne como de leche (35) (40) (25).

2.2.12 Aborto

La Neosporosis es considerada uno de los mayores problemas en los establos, por causar mortalidad fetal y neonatal (16) (12). Reportaron que 42% de abortos en California fueron debidas al *Neospora caninum* y en hatos de Gran Bretaña y Nueva Zelanda, la tasa de aborto anual fue de 16% y 30% respectivamente (41). Los abortos en el ganado debido a *Neospora caninum*, se reportan en fetos de aproximadamente 3.5 meses de gestación a término (1).

2.2.13 Gestación

La infección con *Neospora caninum* en grupos de vacas gestantes, es fácilmente adquirida debido a que la regulación inmune se encuentra suprimida durante esta etapa (42). En estos casos, se asume que la infección fetal es adquirida posterior a la parasitemia materna. Sin embargo, se menciona que más infecciones ocurren en vacas que presentaban infección persistente que las que entraban en gestación (3).

2.2.14 Transmisión lactogénica

Un reciente estudio realizado en el 2007, evidenció la presencia de ADN de *Neospora caninum* en el calostro de vacas seropositivas, lo cual implica la posibilidad de transmisión a través del calostro (43). Asimismo, estudios experimentales han demostrado que terneros neonatales pueden infectarse por la ingestión de leche que contiene taquizoítos (44)

2.2.15 Introducción de ganado nuevo en el hato y el descarte serológico de neospora

Aun cuando la literatura indica que se debe realizar el descarte serológico de algunas enfermedades en el ganado nuevo que ingresa a un hato, como BVDV, BHV-1, brucelosis y *Neospora caninum*, entre otros, la poca previsión de muchos ganaderos así como de la falta de una norma técnica que imponga este diagnóstico como práctica rutinaria para la introducción o importación de nuevos animales, son factores que permiten la introducción de *Neospora caninum* en la ganadería nacional (45).

2.2.16 Vías de transmisión

Horizontal

La infección postnatal en el perro tiene lugar por ingestión de los tejidos de bovinos infectados (fetos abortados y placentas), calostro o leche de origen bovino contaminado con taquizoítos de *Neospora caninum* la infección causa la eliminación de los ooquistes en las heces del perro. Se ha señalado la presencia de *Neospora caninum* en la placenta demostrando la eliminación de ooquistes en las heces de perros alimentados con placentas de vacas seropositivas. La presencia de ooquistes en perros naturalmente infectados se ha informado en escasas ocasiones. La infección por transmisión horizontal del ganado bovino adulto tiene lugar luego que el hospedero definitivo elimina ooquistes que contaminan pastos, forrajes, agua de bebida y piensos almacenados (46).

Se ha demostrado que terneros de hasta una semana de edad pueden ser infectados experimentalmente por vía horizontal mediante la administración de calostro infectado con taquizoítos de *Neospora caninum*, pero al no ser esta una vía natural tendría poca importancia en el ganado vacuno (44).

Vertical

La transmisión vertical transplacentaria es la principal vía de infección en el ganado bovino, siendo la forma de propagación y mantenimiento de la enfermedad, la transmisión de madre a hija fue sugerida como la principal vía por varios autores. (47). quienes demostraron que *Neospora caninum* puede ser mantenida por varias generaciones en un nivel constante de prevalencia aparentemente sin la necesidad de dispersión de un hospedero definitivo, a través de la ruta transplacentaria.

Una vez adquirida la infección (en útero o desde el medio), los animales permanecen infectados probablemente de por vida y pueden transmitir la infección a su descendencia en distintas gestaciones, consecutivas o no, con porcentajes que oscilan entre el 50% y el 95%(46).

2.2.17 Patogenia

La información obtenida hasta el momento sobre el mecanismo de acción patógena de *Neospora caninum* es muy limitada, se ha llegado a determinar que el perro es el hospedero definitivo de este parásito (32) y la única forma de transmisión reconocida en bovinos es la vertical, de madre a cría vía tras placentaria (4). La forma de transmisión horizontal,

por contacto directo, no es muy frecuente en los bovinos, pero sí en caninos. Aunque se llegó a determinar contagio por ingesta de alimento contaminado con ooquistes provenientes de perros infectados y experimentalmente, por ingesta de calostro contaminado con ooquistes (48). Una vez dentro del organismo hospedero, los taquizoítos pueden infectar las células de casi todos los tejidos del animal, lo que evidencia un mayor tropismo hacia las células del sistema nervioso central, células musculares esqueléticas y cardíacas y células endoteliales (1) (33). Experimentalmente, se ha observado que los taquizoítos se adhieren a las células y posteriormente las invaden, rodeándose de una parte de la membrana plasmática de la célula hospedera (1) mediante este proceso el parásito se puede localizar intracitoplasmáticamente en los primeros cinco minutos de contacto con la célula (1) (33).

La multiplicación activa de los taquizoítos de *Neospora caninum* en las células infectadas ocasiona la destrucción de las mismas y da lugar a la aparición de focos de necrosis, los cuales constituyen la principal lesión de esta enfermedad (33). En el área de multiplicación parasitaria, el hospedero desarrolla una respuesta inflamatoria no purulenta, constituida por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas que rodean a dichas áreas necróticas. En el sistema nervioso central el parásito invade de forma activa neuronas y astrocitos, provocando trastornos

neuromusculares graves por destrucción de células nerviosas lo que afecta la transmisión del impulso nervioso (1)(33).

El conocimiento de los mecanismos de acción patógena del parásito responsable de la muerte del feto es también escaso. Se sabe que el aborto puede presentarse entre el tercer y noveno mes de gestación, ocurriendo con mayor frecuencia entre el cuarto y sexto mes (12), se sugiere que el aborto se produciría tanto por la invasión placentaria con la respectiva necrosis y placentitis que se desencadena en este órgano, como por las lesiones inducidas en el feto. Sin embargo, en todos los casos no produce la muerte (1) (33).

La forma de transmisión vertical, frecuente en bovinos, podría mantener la infección latente por muchos años en un mismo hato (47). Se ha establecido una relación directa entre la infección por *Neospora caninum* en vacas de establos lecheros y la presencia de perros infectados por este parásito, también se ha encontrado el parásito en canales (16).

2.2.18 Inmunidad

Es conocida la existencia durante la preñez de inmunosupresión específica (Linfocitos T y B) que hacen a las vacas gestantes más vulnerables a la acción de agentes infecciosos, los linfocitos T supresores

que inhibirían a los linfocitos T helper, por lo tanto disminuiría la respuesta a los antígenos que dependen de ellos. Entre otros factores esta inmunosupresión sería generada por la alta concentración de progesterona que es normal durante la preñez y es agravada en las etapas próximas al parto por la alta producción de corticoides tanto fetales como maternos.

2.2.19 Signos clínicos

En los bovinos adultos el aborto es el único signo clínico observado en hembras gestantes infectadas, los abortos pueden producirse en cualquier época del año y presentarse en forma esporádica, o en forma de brotes endémicos, sin otras señales de enfermedad previa (1) (33). El aborto puede producirse en vacas de primer parto o multíparas, la fertilidad después del aborto no se ve afectada y las vacas entran en celo sin mayor dificultad. Un pequeño porcentaje de animales puede volver a abortar en la gestación siguiente y en otras posteriores (49). Los abortos suelen presentarse entre el tercer mes hasta el término de la gestación siendo la mayor frecuencia de abortos entre el cuarto y el sexto mes de gestación (12). Vacas seropositivas, con anticuerpos contra *Neospora caninum*, son más susceptibles para abortar que vacas seronegativas (16). No se ha establecido si la infección por este parásito puede causar

problemas reproductivos en estadios tempranos de gestación, pero se reportó muerte y momificación de fetos de aproximadamente 3 meses de edad gestacional asociado a brotes de neosporosis (12).

La infección del feto no siempre provoca la muerte y en ocasiones se produce el nacimiento de terneros infectados congénitamente y con signos nerviosos (1). Los fetos presentan lesiones en cerebro e hígado, compatibles con encefalitis multifocal con gliosis y hepatitis multifocal, placenta (47). Corazón compatible con miocarditis difusa no supurativa riñón, músculo esquelético y glándula adrenal. El feto abortado se presenta usualmente autolisado, con acumulación de fluido serosanguinolento en las cavidades del cuerpo (12).

En caninos, el signo clínico más relevante es la paresía e hiperextensión de los miembros posteriores con atrofia de la musculatura de la zona y rigidez del tarso, esto es observable en los primeros seis meses de vida en cachorros que recién infectados. Debido a la presentación de una severa polimiositis y una meningoencefalomielitis diseminada, igualmente se puede presentar miocarditis, neumonía y dermatitis (50).

2.2.20 Lesiones

Se observa inflamación del sistema nervioso central (SNC), cerebro y médula espinal. En el cerebro la inflamación se distribuye multifocalmente, con zonas de necrosis y atrofia, observando además una meningitis, meningoencefalomielitis no supurativa multifocal, además de gliosis focal asociado a cuadros de malacia alrededor de los quistes tisulares (51).

Las lesiones como tal se localizan principalmente en el feto abortado y en la placenta, los adultos aunque estén infectados no manifiestan lesiones evidentes, la encefalitis no supurativa multifocal representaría el hallazgo histopatológico más frecuente (2) (47).

Como consecuencia de la transmisión transplacentaria en los fetos se desarrollan lesiones inflamatorias y degenerativas que aparecen de manera constante en las membranas fetales, cerebro, médula espinal, corazón y esporádicamente en pulmones y riñones (52) Las lesiones en el tejido nervioso se caracterizan por la presencia de focos de necrosis rodeados por células de glía y abundante infiltrado peri vascular de mononucleares, el cuadro histopatológico viene definido por una encefalomielitis multifocal no purulenta (53). En la placenta y el miocardio son frecuentes las grandes áreas de infiltración y de necrosis difusas, la

acción conjunta de la meningoencefalitis, miocarditis y placentitis determina en la mayoría de los casos la muerte del feto (54).

2.2.21 Diagnóstico

Aunque la infección por *Neospora caninum* en los fetos abortados solo puede diagnosticarse en cada caso individual -detección de anticuerpos específicos y/o identificación del parásito en los tejidos (inmunohistoquímica, PCR)-, los análisis serológicos en los animales adultos proporcionan una información inicial acerca de la magnitud del problema.

El diagnóstico etiológico del aborto en el ganado bovino es complejo y laborioso y, de hecho, solamente se consigue determinar su origen en menos del 50% de los casos remitidos a los laboratorios especializados. En aquellos casos en los que se llega a un diagnóstico etiológico, más del 90% corresponden a agentes infecciosos y parasitarios entre los que, actualmente, ocupa un lugar destacado *Neospora caninum*. La valoración adecuada de los datos de la anamnesis y la investigación epidemiológica, así como de los datos obtenidos en el examen clínico y lesiones de los animales afectados (hembras abortadas y sus fetos) debe realizarse siempre, aunque es imprescindible la realización del

diagnóstico de laboratorio para confirmar la etiología del aborto teniendo en cuenta otras posibles causas infecciosas y no transmisibles.

2.2.22 Diagnóstico epidemiológico y clínico

Los datos relativos a la explotación y su entorno y el manejo del rebaño (sistema de explotación, dieta, historial reproductor, sacas, introducción de nuevos animales, tratamientos y vacunaciones, presencia de perros, etc.), la historia clínica de la enfermedad puede facilitar la emisión de un diagnóstico acertado. En los rebaños infectados por *Neospora caninum*, los abortos se producen tanto en novillas como en vacas y pueden presentarse de forma esporádica, endémica o epidémica en cualquier época del año. Puesto que se trata de una infección que fundamentalmente se transmite por vía transplacentaria, la existencia de antecedentes de aborto en alguno de los ascendientes o descendientes de los animales afectados es importante. Así mismo, la repetición del aborto en algunos animales, la edad del feto y la observación de fetos momificados puede ser orientativa. Como ya hemos señalado anteriormente, si la infección intrauterina tiene lugar al inicio de la gestación, la muerte y reabsorción embrionaria o fetal suelen pasar desapercibidos, pero si la infección en el útero tiene lugar más tardíamente, puede producirse el aborto único signo clínico de la infección

en los rebaños de bovinos con presencia o no de momificación fetal. También puede producirse el nacimiento de terneros clínicamente afectados o de animales aparentemente sanos pero con infección subclínica. En las hembras gestantes que han abortado no se observan signos clínicos posteriores y el celo reaparece normalmente. No obstante, el aborto o el nacimiento de animales infectados, con o sin síntomas, puede repetirse en futuras gestaciones (1).

2.2.23 Diagnóstico serológico

La identificación de anticuerpos de *Neospora caninum* en un animal es indicativo de exposición al protozoo (1); para esto se utilizan diversas pruebas serológicas como la: inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), y la aglutinación directa han sido utilizadas para demostrar anticuerpos en el suero o en el fluido corporal de fetos.

2.2.24 Pruebas serológicas

Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

La inmunofluorescencia indirecta detecta, fundamentalmente, anticuerpos que se unen a los antígenos localizados en la superficie celular de *Neospora caninum*. Se considera como resultado positivo

cuando se observa la fluorescencia en toda la superficie del taquizoíto, que normalmente aparece cuando se analizan sueros con títulos moderados o altos. El patrón de IFI varía cuando se analizan sueros con títulos bajos, reduciéndose considerablemente la fluorescencia o quedando restringido a la parte apical del taquizoíto. En la IFI se ha empleado como antígeno taquizoítos de *Neospora caninum* aislados de origen bovino, no existiendo evidencias de que las posibles diferencias antigénicas entre los diferentes aislados puedan afectar a la precisión de la prueba.

La IFI requiere para su realización de una experiencia previa y el tiempo necesario para la realización de la técnica en comparación con el ELISA y la subjetividad inherente a su sistema de interpretación, hacen que en la actualidad se utilice cuando se trabaja con un número reducido de muestras. Esta técnica serológica se ha empleado en el diagnóstico de la infección y en estudios epidemiológicos en un gran número de especies, incluyendo el perro, el zorro, el gato, el ganado bovino, la cabra, la oveja, diversas especies de roedores y primates. Asimismo, la IFI ha sido considerada como la técnica de referencia ("goldstandard") en la neosporosis, con la cual han sido comparadas otras técnicas serológicas. Esta prueba tiene una sensibilidad de 98% y una especificidad de 99% (55).

Prueba de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Recientemente, se han desarrollado numerosas pruebas como la ELISA, para la detección de anticuerpos específicos, cuya sensibilidad es adecuada y la especificidad elevada. La sencillez y rapidez de su realización y la fácil interpretación de los resultados, la capacidad de automatización y el bajo costo económico son ventajas a tener en cuenta cuando se analizan un número elevado de muestras. Estas pruebas utilizan distintos tipos de antígenos: taquizoitos sonicados, taquizoitos fijados con formalina, antígenos recombinantes o antígenos incluidos en partículas.

Dentro de ELISA el más utilizado es ELISA indirecta, el cual emplea antígeno soluble de taquizoito, mezcla de antígenos intracelulares y de membrana de los diferentes aislados de *Neospora caninum* BPA1 y NC-1, puede ser usado con muestras de suero, leche y líquidos fetales para la detección de anticuerpos (56).

2.2.25 Diagnóstico no serológico

Este diagnóstico se ha basado en la detección del parásito o las lesiones causadas por este en los tejidos fetales mediante técnicas histológicas convencionales (tinción de cortes histológicos con

hematoxilina y eosina) e inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos frente a *Neospora caninum*.

2.2. 26 Examen histopatológico

La histopatología sobre tejidos bovinos resulta una técnica diagnóstica relevante en las infecciones a *Neospora caninum*. Las muestras para remitir al laboratorio son: cerebro, pulmón, corazón, hígado, bazo, riñón, músculos estriado; que son fijados en formalina al 10%, para luego fijarse en parafina, teñirse con hematoxilina-eosina (H-E) y ser vistas al microscopio (14).

El *Neospora caninum* se localiza con mayor frecuencia en el cerebro (SNC) y en el corazón (miocardio) de los fetos abortados además de la placenta.

También, es más frecuente la detección de taquizoítos del parásito en los tejidos de los fetos abortados al principio de la gestación, apareciendo los quistes tisulares en mayor número en los terneros mortinatos o en animales neonatos con sintomatología y sacrificados antes de los 7 días de vida (1) (12).

Debe tenerse en cuenta que el material a estudiarse procede de un aborto y suele estar lisado como consecuencia de los procesos de

descomposición lo que posiblemente dificulte la observación de las lesiones, es por eso que la remisión de muestras deberá de hacerse con la mayor celeridad una vez acontecido el aborto (54) (1).

2.2.27 Tratamiento

No se conoce actualmente ningún tratamiento específico de la enfermedad; debido a la dificultad de eliminar los bradizoitos que se hallan en los quistes tisulares, y a la eliminación de las drogas en la leche cuando son administradas a vacunos de producción (15). La mayoría de los resultados en farmacoterapia han sido obtenidos a través de cultivos celulares o mediante la administración de fármacos a ratones infectados experimentalmente con neosporosis (57).

Recientemente se ha informado que utilizando toltrazuril y ponazuril, los cuales son derivados de una droga llamada triazinona utilizada en el tratamiento de las coccidiosis, se logró disminuir las lesiones cerebrales de terneros inoculados experimentalmente, quedando demostrado que actualmente no existe tratamiento en los bovinos que los libere de la enfermedad(38).

El tratamiento de la neosporosis en caninos ha sido satisfactorio en algunos perros con signos iniciales de la enfermedad, la respuesta del paciente dependerá del estadio en que se encuentre la enfermedad al

momento de iniciarse el tratamiento. Se ha establecido que una combinación de trimetoprim y sulfadiazina en una dosis standard de 15 mg/kg, dos veces al día, y pirimetamina a 1 mg/kg por día durante cuatro semanas revierte la parálisis asociada a *Neospora caninum* en algunos perros. Trabajos experimentales in vitro e in vivo con diferentes drogas no han dado resultado en bovinos (1) (33).

2.2.28 Control y prevención

Las medidas preventivas y de control están orientadas reducir la exposición de los hospederos naturales (bovinos y perros); sin embargo, deben estar adecuadas a las características de cada explotación. Por lo tanto, lo más recomendable sería, evitar el contacto de los perros con el ganado sobre todo en época de parición.

2.2.29 Control de la transmisión vertical

La transmisión congénita es la forma más común de infección de *Neospora caninum* en los bovinos (1).

El nacimiento de terneros clínicamente sanos, pero infectados transplacentariamente es otro problema en el control de la enfermedad, porque estos animales pueden ser utilizados para la reposición de animales y de esta manera la parasitosis permanece en el rebaño. Por lo

tanto, la primera medida de prevención y control es el monitoreo serológico de todos los animales del hato, con la intención de reducir los animales seropositivos dentro del hato mencionan las siguientes medidas para este fin:

Eliminar las vacas seropositivas si la tasa de infección es alta y se comprueba gran implicancia de neosporosis en la tasa de abortos.

Eliminar las vacas seropositivas si la tasa de infección es baja aunque la neosporosis no intervenga en la tasa de abortos.

Si no es posible la eliminación de animales, se opta por la separación gradual en el siguiente orden: vacas seropositivas con abortos que tienen crías seropositivas primero, luego vacas seropositivas con antecedentes de aborto y, por último, vacas seropositivas.

Evitar la reposición con terneras infectadas. Las terneras con madres seropositivas que nacen sin infección deben ser alimentadas con calostro de madres seronegativas.

2.2.30 Control de la transmisión horizontal

El conocimiento de esta ruta de transmisión es limitado. A pesar que no existen reportes que demuestren que esta se presente en forma natural y que presumiblemente ocurra en forma escasa, se sabe que el

perro es el único hospedador definitivo y con esta información se han podido plantear medidas para reducir la contaminación ambiental con ooquistes como.

Eliminar los fetos, fluidos y placentas evitando que puedan ser ingeridos por los perros, lamidos por la hembra abortada o entrar en contacto con otras vacas.

Evitar la exposición del alimento (pienso, concentrado, ensilaje, pastos, etc.) y agua con las heces de perros.

Controlar y disminuir en lo posible el contacto de perros con lugares de alojamiento de animales.

Evitar alimentar a los perros con carne cruda.

2.2.31 Prevención y vacunación

Si bien las pérdidas reproductivas pueden presentarse más de una vez en gestaciones subsiguientes, las tasas de repetición de aborto por neosporosis son relativamente bajas (menores al 5%) (16) estudios no solo experimentales sino también de campo (32) avalan la presencia de mecanismos inmunes que protegen contra el aborto en bovinos crónicamente infectados.

Para evitar la infección posnatal posiblemente sea necesario el desarrollo de vacunas orales capaces de generar una respuesta inmune a nivel de mucosa gastrointestinal, la cual podría limitar el acceso al sistema linfático y gastrointestinal. Diversos antígenos, asociados a los gránulos densos, micronemas y otras proteínas de superficie de los taquizoítos, serían capaces de inducir una respuesta inmune de protección, además diversos clones de ADN pertenecientes a estos antígenos han sido descritos y permitirían el desarrollo de vacunas a sub-unidades (59).

Una vacuna inactivada con Havlogen como adyuvante (NeoGuard[®]) ha sido recientemente aprobada por el Departamento de Agricultura de los EE.UU; y el laboratorio Intervet describen en su boletín técnico que la vacuna es segura para su uso en bovinos preñados sanos. En uno de sus ensayos, vaquillonas preñadas vacunadas con dos dosis a los 56 y 77 días de gestación en forma subcutánea (SC) fueron posteriormente desafiadas con un inóculo intramuscular a los 95 días de gestación, mostrando que el grupo de 18 animales sin inmunizar tuvo una tasa de abortos del 22 %, mientras que las 18 vaquillonas inmunizadas tuvieron terneros vivos y sanos. Por otro lado, se demostró que aquel inmunógeno no previene la transmisión vertical de *Neospora caninum* en bovino (38).

Los actuales inmunógenos comerciales ocasionan la producción de anticuerpos anti-n. caninum los cuales no pueden ser diferenciados de aquellos producidos en infecciones naturales; más aún, existe controversia debido a la utilización de la vacuna debido a que la eliminación de animales seropositivos ha sido sugerida como medida de control.

2.2.32 Zoonosis

Hasta el momento, no se ha detectado la presencia de *Neospora caninum* en el hombre, pero su estrecha relación con *Toxoplasma gondii* patógeno importante en mujeres gestantes y en individuos inmunodeprimidos y el hecho de que la infección haya sido establecida experimentalmente en el macaco apuntan la posibilidad de la infección humana. En estudios realizados en mujeres con historia de abortos se han detectado la presencia de anticuerpos frente a *Neospora caninum*. Aunque la tasa de seropositividad fue muy baja, estos resultados indican que anticuerpos frente a *Neospora caninum* pueden estar presentes en el suero humano y no se debe descartar la posibilidad de que la infección por este parásito afecte al hombre.

2.2.33 Factores epidemiológicos

Que condicionan la presentación de *Neospora caninum* en bovinos de la raza *holstein* en el distrito de Locumba.

La edad condiciona la presencia del parasito (35) incrementando la seroprevalencia en animales de mayor edad.

La procedencia condiciona la presentación del parásito, tienen mayor posibilidad de infectarse (38) los animales procedentes de otro lugares.

Los establos donde han tenido problemas de aborto y mortalidad neonatal, una de las causas es la presencia del parásito en las explotaciones.

En cuanto al tercio de gestación (33) indica se produce el aborto en el segundo tercio.

Los productos de la gestación por desconocimiento de la enfermedad dejan a la intemperie o consume directamente el hospedero definitivo.

La presencia de perros y cánidos salvajes en los establos actúan como hospederos definitivos de la enfermedad favoreciendo la transmisión horizontal.

2.4 Definición de términos:

Todas las definiciones de los términos, técnicas, métodos, modelos

Epidemiología

Es una disciplina científica que estudia la distribución, la frecuencia, los determinantes, las predicciones y el control de los factores relacionados con la salud y con las distintas enfermedades existentes en poblaciones humanas específicas (16).

Huésped

Es decir organismo que aloja un parásito o simbiote (34).

Correlación

Indica la fuerza y la dirección de una relación lineal y proporcionalidad entre dos variables estadísticas (35).

Parasitología:

Es una rama de la biología que estudia el fenómeno del parasitismo. Por un lado, estudia a los organismos vivos parásitos y la relación de ellos con sus hospedadores y el medio ambiente (38).

Enfermedad

En términos generales, un proceso y, también, el *estatus* consecuente de afección de un ser vivo, caracterizado por una alteración perjudicial de su estado de salud (32).

Sero prevalencia

Prevalencia global de una enfermedad transmitida por la sangre dentro de una población definida en un tiempo determinado (1).

Anticuerpos:

Los anticuerpos (también conocidos como inmunoglobulinas, abreviado Ig) son glicoproteínas del tipo gamma globulina

Neonatal

Este período es importante porque representa una etapa muy corta de la vida; sin embargo, en ella suceden cambios muy rápidos que pueden derivar en consecuencias importantes para el resto de la vida del recién nacido (52).

Neosporosis

Es una enfermedad de distribución mundial causada por el parásito *Neospora caninum*. Afecta fundamentalmente al ganado bovino, y es considerada la primera causa de aborto en numerosos países (32).

Serología

Es el estudio que permite comprobar la presencia de anticuerpos en sangre. Es una prueba fundamental a la hora de realizar donaciones de sangre y transfusiones.

Zoonosis

Es cualquier enfermedad que puede transmitirse de animales a seres humanos (35).

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de investigación

El presente trabajo de investigación es de carácter prospectivo, transversal y explicativa – analítico de observación porque establece relación entre variables y está dirigido a explicar el comportamiento de los fenómenos y medir la relación entre las variables estudiadas para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en la cuenca lechera de Tacna.

3.2 *Ambito de estudio*

El presente trabajo se realizó en la cuenca lechera de Tacna. Ubicada estratégicamente y geopolíticamente en el cinturón del Atlántico y del Pacífico sur entre los países de Chile y Bolivia en la costa meridional del Perú, a una latitud de 18° 00' 21" y una longitud de 70° 15' 00' y con una altitud media de 558 msnm.

Comprende el centro del valle del Caplina; entre sus características climáticas mostró una temperatura que fluctúa entre 5 a 25°C, correspondiendo a un clima templado y benigno; abarca una superficie territorial de 16,076 Km², con una población de 270,000 habitantes y una densidad poblacional 16.7 hab. /km².

3.3 Población y muestra

Uno de los métodos que permiten determinar el tamaño de la muestra para un estudio de evaluación de una prueba diagnóstica, se basa en la sensibilidad y la especificidad (proporción de verdaderos positivos y la proporción de verdaderos negativos).

Por tanto, el cálculo del tamaño de muestra para construir un intervalo de confianza (IC), con una determinada precisión, para la sensibilidad, especificidad de una prueba diagnóstica, se basa en el método para una proporción.

Estos datos son excluyentes, es decir, solo uno de ellos ha de ser declarado. En nuestro caso se ha considerado la seroprevalencia.

Con la ecuación para estimar el tamaño de la muestra y precisión para pruebas diagnóstica y considerando una sensibilidad de 95 %, especificidad de 96 % y una prevalencia de 40,4 0% y con 10 % de

precisión, se estimaron un tamaño de 179 bovinos para el grupo de estudio con patología en relación con el test estudiado.

3.3.1 Población de animales:

Para el desarrollo del presente estudio se utilizó vaquillas, vaquillonas y vacas de la raza holstein, ubicadas en la cuenca lechera de Tacna de propiedad de los ganaderos, los mismos que fueron identificados en registros. Asimismo se ha elaborado una ficha de encuesta para el seguimiento de los factores epidemiológicos proporcionados. Con una población de 2, 234 bovinos por categorías de las zonas de estudio como Sama, Ite y Locumba (61).

Tabla 1

Distribución de la población de bovinos

Categorías	Locumba	Sama	Ite	Total
Vacas	383	507	688	1578
Vaquillas	102	105	132	339
Vaquillonas	71	103	143	317
Total	556	715	963	2234

Fuente: Censo INEI - 2012

3.3.2 Tamaño de la muestra

Uno de los métodos que permiten determinar el tamaño de la muestra para un estudio de evaluación de una prueba diagnóstica, se basa en la sensibilidad y la especificidad (proporción de verdaderos positivos y la proporción de verdaderos negativos). Por tanto, el cálculo del tamaño de muestra para construir un IC, con una determinada precisión, para la sensibilidad, especificidad de una prueba diagnóstica, se basa en el método para una proporción.

Los factores que intervienen en el cálculo son:

Sensibilidad, en porcentaje.

Especificidad, en porcentaje

Razón entre los tamaños de muestra de no enfermos y enfermos (R)

Prevalencia de la enfermedad.

Estos datos son excluyentes, es decir, solo uno de ellos ha de ser declarado

Para el presente estudio se utilizará la fórmula:

$$N = \frac{(z_{1-\alpha/2})^2 \cdot Se \cdot (1-Se)}{e^2} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

$$Z_{1-\alpha/2} = 1,96 \text{ (95 \% de confianza)}$$

$$\text{Error (e)} = 0,025$$

$$\text{Sensibilidad estimada (Se)} = 0,97$$

Procedimiento:

$$= \frac{(1,96/0,025)^2 \cdot 0,97 \cdot (0,03)}{0,025^2}$$

$$= 6\,146 \cdot 0,0291$$

$$= 178,84$$

Muestra: 179 unidades de estudio

Tabla 2

Distribución de la muestra de estudio

Muestra				
Categorías	Locumba	Sama	Ite	Total
Vacas	32	40	56	128
Vaquillas	7	9	10	26
Vaquillonas	6	8	11	25
Total	45	57	77	179

Fuente: Elaboración propia

3.4 Operacionalización de las variables

3.5. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

Variable	Indicador	Unidad/Categoría	Escala
Diagnóstico de <i>Neospora caninum</i>	Prueba inmunofluorescencia antígeno Ig G, Ig M	Positivo (+) Negativo (-)	Nominal
Categoría bovina	Prueba de ELISA antígeno Ig G, Ig M		
Categoría del ganado	Edad del ganado	Vaca Vaquillona Vaquilla	Nominal
Abortos	Expulsión del feto	Sí No	Nominal
Tercio de aborto	Momento que se dio el aborto	Primer tercio Segundo tercio Tercer tercio	Ordinal
Destino de placenta	Conocimiento sobre el destino de la placenta	Entierra Ignora Da al perro	Nominal
Presencia perros	Existencia de perros en el ato.		
Conoce <i>Neospora caninum</i>	Conocimiento de la enfermedad	Sí No Sí No	Nominal Nominal
Vías de transmisión	Madre - cría Pasto – agua	Vertical Horizontal	Nominal
Control sanitario	Aplicación de vacunas al ganado	Sí No	Nominal

3.5.1 Obtención de muestras

Las muestras serán obtenidas entre los meses de abril y mayo del 2014. Se tomarán muestras de sangre por punción de la vena Coccígea a 179 animales, por zonas y categorías, vacas, vaquillas y vaquillonas. El suero se obtendrá por centrifugación y será conservado en viales a una temperatura de congelación (-20 °C) hasta el día de su procesamiento en el laboratorio.

3.5.2 Procedimientos utilizados

Para el desarrollo del presente estudio se ha elaborado una ficha de encuesta de preguntas relacionado sobre la importancia de la *Neospora caninum*, que buscar identificar y dar un seguimiento a los diversos factores epidemiológicos que se vinculan al desarrollo epidemiológico de la enfermedad parasitaria, la ficha se aplicó en el momento de la obtención de la muestra de sangre.

3.5.3 Determinar toma de muestras sanguíneas

Para la recolección de datos se utilizó un marco muestral de los propietarios de ganado vacuno, proporcionado por las municipalidades distritales (Sama, Ite, y Locumba) de la región de Tacna.

Selección e identificación de animales a través de un arete en forma aleatoria y proceder con el registro de datos.

Identificación de los vacutainer sin coagulante con las viales para el plasma sanguíneo.

Se recolectaron 179 muestras por zonas y categorías.

La toma de muestra se realizó de la vena coccígea de la cola, la cantidad de 5 ml de sangre por animal

Luego se procedió con la centrifugación eléctrica a 3,000 rpm durante 15 minutos y la separación del plasma sanguíneo 3,5 ml con una micro pipeta Pasteur y el traslado respectivo a las viales.

Sellado herméticamente y rotulado de las viales y embalaje pertinente.

Conservación de las muestras de plasma en una congeladora a -20°C . Hasta el momento de su análisis respectivo.

El transporte de las muestras se realizó en termos de refrigeración, dispuestas en hileras la misma que tuvo una duración de 6 horas (Tacna – Puno), entregado al laboratorio de histopatología de la Universidad Nacional del Altiplano para su análisis.

3.5.4 Métodos y procedimientos

3.5.4.1 Prueba de inmunofluorescencia indirecta

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), detecta fundamentalmente, anticuerpos que se unen a los antígenos localizados en la superficie celular de *Neospora caninum*. Se considera como resultado positivo cuando se observa la fluorescencia en toda la superficie del taquizoíto, que normalmente aparece cuando se analizan sueros con títulos moderados o altos. El patrón de IFI varía cuando se analizan sueros con títulos bajos, reduciéndose considerablemente la fluorescencia o quedando restringido a la parte apical del taquizoíto. Inmunofluorescencia indirecta (IFI), se ha empleado como antígeno taquizoito de *Neospora caninum* de aislados de origen bovino, no existiendo evidencias de que las posibles diferencias entre los diferentes aislados puedan afectar a la precisión de la prueba.

La prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI), requiere para su realización de una experiencia previa y el tiempo necesario para su realización de la técnica en comparación con la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), y la subjetividad inherente a su sistema de interpretación, hacen que en la actualidad se utilice cuando se trabaja con un número reducido de muestras. Esta técnica serológica se ha

empleado en el diagnóstico de la infección y en estudios epidemiológicos en un gran número de especies, incluyendo el perro, el zorro, el gato, el ganado bovino, la cabra, la oveja, diversas especies de roedores y primates. Así mismo la prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI), ha sido considerada como la técnica de referencia en la neosporosis, con la cual han sido comparadas otras técnicas serológicas, esta prueba tiene una sensibilidad de 98 % y una especificidad de 99 % (55).

3.5.4.2 Prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas indirecta (ELISA)

Recientemente, se han desarrollado numerosas pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos específicos, cuya sensibilidad es adecuada y la especificidad elevada. La sencillez y rapidez de su realización y la fácil interpretación de los resultados, la capacidad de automatización el bajo costo económico son ventajas a tener en cuenta cuando se analizan un número elevado de muestras. Estas pruebas utilizan distintos tipos de antígeno, taquizoito zonificados, taquizoítos fijados con formalina, antígenos recombinantes o antígenos incluidos en partículas.

Dentro de ELISA el más utilizado es la prueba de de Ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas indirecta (ELISA), el cual emplea antígenos solubles de taquizoítos, mezcla de antígenos intracelulares y de

membrana de los diferentes aislados de *Neospora caninum* BPA1 y NC – 1, pueden ser usado con muestras de suero, leche y líquidos fetales para la detección de anticuerpos (56).

3.5.5 Procedimiento

Acciones y actividades para la ejecución del proyecto:

Se realizaron reuniones de sensibilización del tema sobre la problemática ganadera infestada con *Neospora caninum*, con participación multisectorial.

Coordinación con los productores agrarios y autoridades locales

Selección de hatos para la toma de muestras, luego registrar los datos.

Toma de muestra

Conservación de las muestras en termos apropiados.

Procesamiento de las muestras obtenidas

Análisis de la información obtenida

Informe final

3.5.6 Materiales e instrumentos

3.5.6.1 Materiales de apoyo

Computadora Hp pavilium Procesador AMD AHLOM X2 DUAL CORE 6.5,
memoria instalada 3,00 GB, tipo de sistema operativo 32 bits.

Cámara digital Canon Pauer Shot A 420 Megas 3.2 Ins.

3.5.6.2 Materiales instrumentos de campo

179 jeringas hipodérmicas de 15 ml de material de plástico

179 tubos de bacutainer de 10 ml sin parafina de litio con agujas de doble
entreda

179 viales con tapa rosca para almacenar el plasma 2 a 3 ml

Bretes de campo de madera para la sujeción de animales.

Sogas de sujeción de animales 80 metros.

Libretas de campo pelikan.

Guantes obstétricos descartables

Lapiceros y tableros

Desinfectantes QAC

3.5.6.3 Materiales instrumentos de laboratorio

Pipetas de precisión para dispersar 0,005 ml y 0,500 ml. Los volúmenes de los reactivos listados en el apartado de procedimiento del test requieren una pipeta con una precisión inferior o igual al 5%.

179 Puntas de pipeta desechables para cada muestra LBY GERMANY

Probeta graduada de 100 ml, 200 ml y 500 ml para la solución de lavado LBY GERMANY.

Lectura a través del espectrofotómetro de las 179 microplacas, observar las reacciones positivo o negativo a *Neospora caninum*.

Tubos de plástico o vidrio para diluir las muestras de 200 ml, 400 ml

Erlenmeyer de diferente para diluir las muestras de 400 ml, 500 ml.

02 microplacas de 96 pocillos cada uno, IDEXX Neospora x 2 AB Test Kit de ELISA, para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* para vacunos.

02 gradillas de madera con una capacidad de 192 para el colocado de los tubos de trabajo.

Beakers de 100 ml, 200 ml de vidrio para las diluir las muestras LBY GERMANY.

01 litro de agua destilada o desionizada para el lavado de las microplacas y materiales de trabajo LBY GERMANY.

Dispositivo para dispensar y aspirar la solución de lavado. LBY GERMANY.

Bandejas de porcelana 40cm x 20cm para el colocado de los tubos y viales de trabajo.

Papel absorbente Elite doble hoja.

Pipetas graduadas de vidrio 1ml, 2ml, 5ml, 10ml. LBY GERMANY.

Centrifuga Greetmed de 3, 000 rpm. por 30 minutos para el separado del suero sanguíneo.

Estufa incubadora National Appliance Company modelo # 55105 volts 220 a.c. 18 – 25 ° C por 30 minutos.

Congeladora para el colocado de las muestras de suero sanguíneo - 20°C hasta el procesamiento de las mismas

Potenciómetro medidor de PH

Microscopio de inmunofluorescencia de 100X a 250X la confirmación puede ser hecha a 400X.

Micro pipetas multicanal de 5 ml – 50 ml de vidrio LBY GERMANY.

Micro pipetas multicanal 20 ml – 200 ml LBY GERMANY.

3.5.7 Dilución de sueros prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas indirecta (ELISA)

Preparar las microplacas a utilizar y colocarlo sobre la mesa.

Usar dos microplacas de 96 pocillos para realizar las diluciones

Diluir el suero desde 1/25 hasta 1/200 colocar 8 ul de suero en 192 ul de PBS (1/25) en el primer pocillo.

Verter 100 ml control negativo en dos pozos.

Verter 100 ml control positivo en dos pozos.

Colocar cantidades constantes de PBS (solución de trabajo), 100 ul en todos los pocillos excepto en el primero, es decir desde la dilución 1/50), homogenizar y así sucesivamente hasta la última dilución.

Incubar las microplacas durante 30' a una temperatura de 20°C.

Desechar el contenido de las microplacas y lavar 4 veces con agua desionizada.

Transferir 100 ul de sustrato del primer pocillo (1/25) al segundo pocillo (1/50), homogenizar y así sucesivamente hasta la última dilución.

Incubar las microplacas durante 30´ a una temperatura de 20°C.

Colocar 100 ul de solución 1/200 en el portaobjeto que contiene el antígeno.

Colocar las microplacas por separado en el espectrofotómetro para la lectura de cada placa.

3.5.8 Dilución de los sueros prueba de inmunofluorescencia indirecta

Sacar las láminas con cuidado a temperatura ambiente de su estuche

Colocar el suero diluido 1/200 sobre las paredes, con PH 7.2.

Incubar el antígeno con el suero problema 37 °C durante 30 minutos en cámara húmeda

Después de la incubación lavar la lámina (sumergir) en solución baffle carbonato (1/4) por 10 minutos en agitación.

Secar la lámina sobre papel toalla

Agregar 15 ul de conjugado (1/100) a cada pocillo

Incubar a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda

Después de la incubación lavar la lámina (sumergir) en solución buffer carbonato (1/4) por 10 minutos en agitación

Secar la lámina sobre papel toalla

Montar inmediatamente con glicerina +*buffer* carbonato 50%, colocar en la parte externa del pocillo y colocar laminilla cubreobjeto

Observar en microscopio de inmufluorescencia 100X a 250X confirmación a 400X. Si hay fluorescencia del taquizoíto es positivo no florece es negativo.

3.5.9 Condiciones de conservación y eliminación de la muestra

3.5.9.1 Conservación

Todas las muestras de cualquier suero fueron almacenados en viales de 2 ml. en congelación (-20°C).

3.5.9.2 Almacenamiento

Para almacenar el material biológico usar viales de buena calidad con tapas de rosca y una cinta selladora que asegure el cierre hermético, previo

al almacenamiento deberán ser identificados y desinfectados externamente con el desinfectante de uso.

3.5.9.3 Eliminación

Manejar las muestras como material biológico no infeccioso, mantener los envases de muestra cerrados hasta su disposición final. Una vez procesada la muestra, desinfectar químicamente y eliminar en un basurero de desechos

3.5.10 Cálculo y expresión de resultados

3.5.10.1 Lecturas

La lectura de las láminas de la prueba inmunofluorescencia Indirecta se utilizara el microscopio de inmunofluorescencia con los objetivos de 100X a 250X, con confirmación de 400X, mientras que para las muestras, de ELISA indirecta, se utilizara el microscopio de Barrido a 40X.

3.5.11 Interpretación de resultados

Se utilizarán las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo de inmunoenzimático ligado a enzimas indirecta (ELISA), para la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum*. La unión

antígeno – anticuerpo (Ag-Ac) se pone de manifiesto utilizando un conjugado anti especie (Ig G) marcado con isotiocianato de fluorescencia.

El suero será considerado positivo al observarse fluorescencia completa del taquizoíto, mientras que la muestra será negativa cuando no se aprecia la fluorescencia se presente en forma parcial o verdosa homogénea o tinción de fondo (36).

El suero será considerado positivo cuando en la prueba de Elisa indirecta, el taquizoito se tiñe de color verde intenso, mientras que la muestra será negativa cuando se aprecia un color claro. (62).

3.5.12 Reactivos prueba de inmunofluorescencia indirecta

Neospora caninum inmunofluorescencia indirecta (IFI) positivo control
Bovine 1ml.

Neospora caninum inmunofluorescencia indirecta (IFI) negativo control
Bovine 1ml.

Faserum Diluting Buffer 100 ml. Bovine – Serum Albumin

Anti- Bovine Fictc Conjugado 10 ml.

Ferarda Mounting Fluid – 50% Glicerol 50% Baffer 10 ml- virred

Sustrate Slide 12 Wel Slide – Neospora *caninum* – virred USA

4 x FA Rinse Buffer UNSA – Virred

Re – Freex – r Brix Foam Refrigerand

3.5.13 Reactivos prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas indirecta (ELISA)

Control positivo IDEXX Neospora x 2 3.0 ml.

Control negativo IDEXX Neospora x 2 3.0ml.

Sotp Solution d' arret Stopplosun, 60 ml.

Conjugue IDEXX Neospora x2 30 ml.

TMB Substrate TMB 60 ml. IDEXX 2 PLACAS Neospora.

3.6. Análisis estadístico

3.6.1. Para los objetivos 1 y 3

Para la descripción de las variables respuesta del presente trabajo de investigación, se ha utilizado medidas de tendencia central (medias) y medidas de control, para conocer la seroprevalencia y el comportamiento epidemiológico de la *Neospora caninum* por categorías de la cuenca

lechera de Tacna, los datos fueron procesados en una hoja electrónica dentro del paquete (SPSS) versión 21(ver anexos).

Para el procesamiento de datos estadísticos será mediante software y el programa SPSS versión 21.

3.6.2 Para el objetivo 2

Para determinar los parámetros de valoración de las pruebas diagnósticas de IFI y ELISA se ha utilizado la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y razones de verosimilitud, intervalos de confianza para determinar la sensibilidad y especificidad, y determinar la capacidad para diagnosticar la presencia y ausencia de la neosporosis bovina.

Para el procesamiento de datos estadísticos será mediante software y el programa SPSS versión 21.

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Distribución de la muestra según cuencas lecheras por categorías, 2014

Tabla 3

Población de ganado vacuno raza *holstein* por categorías, según cuencas lecheras de la región Tacna, 2014.

Categorías	Cuencas lecheras							
	Locumba		Ite		Sama		TOTAL	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
Vacas	32	1,88	40	22,34	56	31,29	128	71,51
Vaquillas	7	3,91	9	5,03	10	5,59	26	14,53
Vaquillonas	6	3,35	8	4,47	11	6,14	25	13,97
TOTAL	45	25,14	57	31,84	77	43,02	179	100,00

Fuente: Elaboración propia

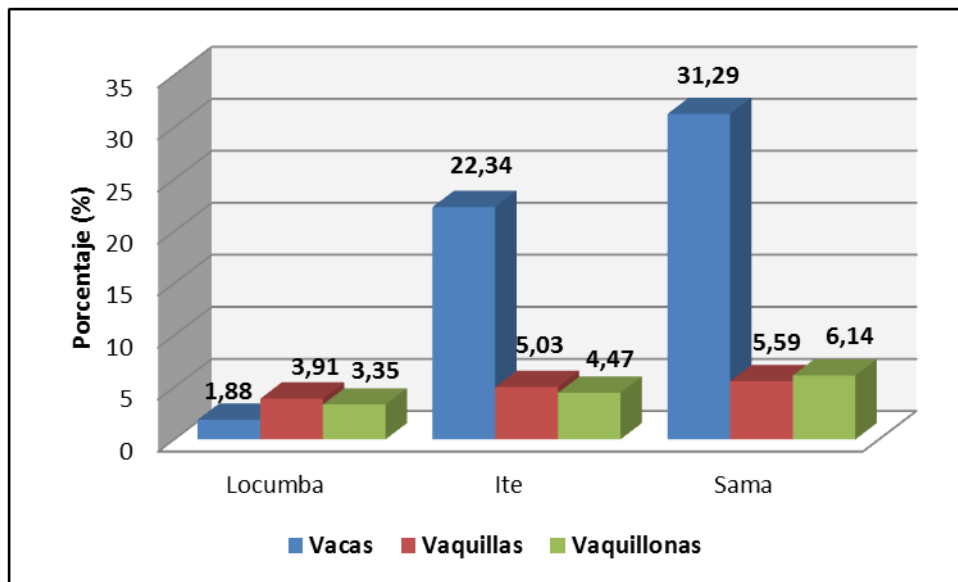


Figura 3 Población de ganado vacuno raza *holstein* por categorías, según cuencas lecheras de la Región Tacna, 2014.

Fuente: Tabla 3

Interpretación

En la Tabla 3 y Figura 3, se observan la distribución de la muestra de estudios por categorías y distritos, apreciándose que del total casi la tercera parte (31,29 %) son vacas del distrito de Sama, seguido del 22,34% de vacas que se ubican en Ite, prácticamente más de la mitad de la muestra corresponde a los bovinos de Sama e Ite (53,63 %). En cuanto a la categoría *vaquillas*, que tanto Ite y Sama aportan de manera similar un 5%, en tanto que Locumba aporta el 3,91%. Respecto a las vaquillonas, igualmente la mayoría proviene de Sama (6,14 %) ya que Ite aporta un 4,47 %, mientras que Locumba un 3,35%. La distribución de los bovinos corresponde con la población de animales, la que efectivamente, es más numerosa en Sama e Ite.

4.2 COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE LA NEOSPOROSIS BOVINA POR CUENCAS LECHERAS

Tabla 4

Seroprevalencia de *Neospora caninum* en el ganado vacuno de las cuencas lecheras de Tacna, 2014

Pruebas	Seroprevalencia	N°=179	% =100
IFI	Positivo	49	27,37
	Negativo	130	72,63
ELISA	Positivo	44	24,58
	Negativo	135	75,42

Fuente: Resultados de laboratorio

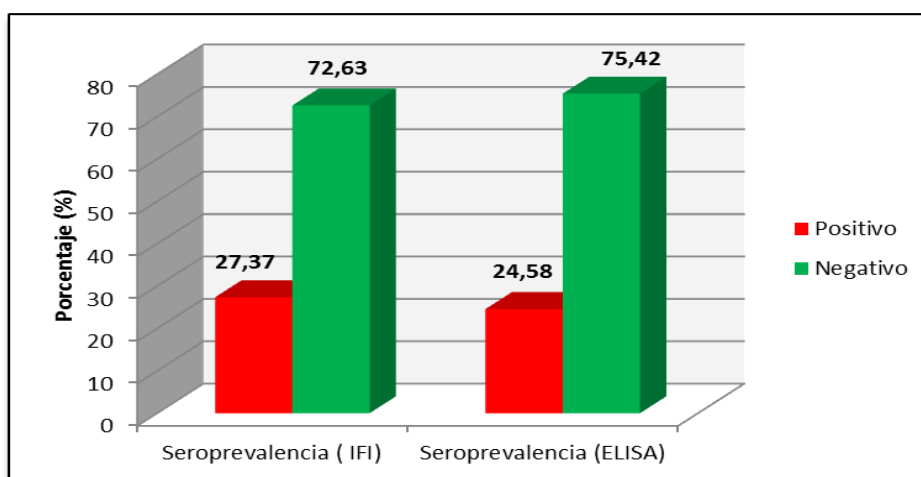


Figura 4 Seroprevalencia de *Neospora caninum* en el ganado vacuno de las cuencas lecheras de Tacna, 2014

Fuente: Tabla 4

Interpretación:

En la Tabla 4 y Figura 4 se presentan los resultados de la seroprevalencia de *Neospora caninum* realizada a través de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático indirecta (ELISA) en las cuencas lecheras de la región Tacna. En la prueba de IFI de 179 muestras obtenidas resultados positivos 49 animales que representan el 27,37 %; en tanto que con la prueba de ELISA, resultaron positivos 44 animales que implican el 24,58.

Tabla 5

Seroprevalencia de neosporosis por categoría bovina según la prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI) en las cuencas lecheras de Tacna, 2014

IFI	Vaquilla		Vaquillona		Vaca	
	N°	%	N°	%	N°	%
Positivo	14	53,85	14	56,00	79	61,72
Negativo	12	46,15	11	44,00	49	38,28
Total	26	100,00	25	100,00	128	100,00

Fuente: Elaboración propia

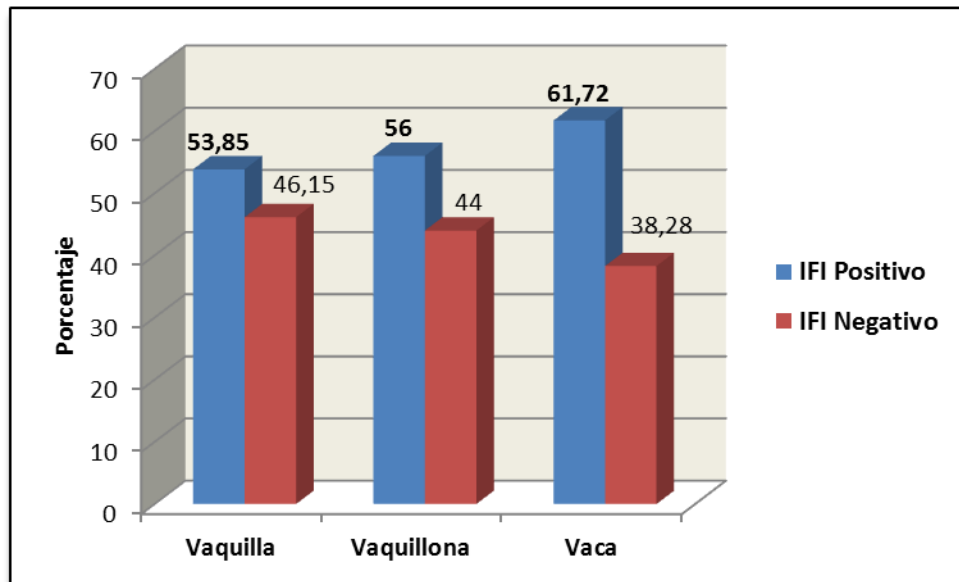


Figura 5 Seroprevalencia de neosporosis por categoría bovina según la prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI), en las cuencas lecheras de Tacna, 2014.

Fuente: Tabla 5

Interpretación

En la Tabla 5 y Figura 5 se presentan los resultados de la seroprevalencia de *Neospora caninum*, por categorías, realizada a través de la prueba de IFI en las cuencas lecheras de la región Tacna se muestra que en la categoría vaquilla de 26 muestras obtenidas resultaron positivos 14 animales que representan el 53,85 %; en tanto que en la categoría vaquillona de 25 muestreadas resultaron positivos 14 animales que implican el 56,00 %; y en categoría vacas de 128 muestreadas

resultaron positivos 79 animales con un 61,72 % de seroprevalencia; al parecer la categoría de vacas muestra mayor seroprevalencia respecto a las demás categorías.

Tabla 6

Seroprevalencia de neosporosis por categoría bovina según la prueba ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), en las cuencas lecheras de Tacna, 2014.

ELISA	Vaquilla		Vaquillona		Vaca	
	N°	%	N°	%	N°	%
Positivo	14	53,85	14	56,00	80	62,50
Negativo	12	46,15	11	44,00	48	37,50
Total	26	100,00	25	100,00	128	100,00

Fuente: Elaboración propia

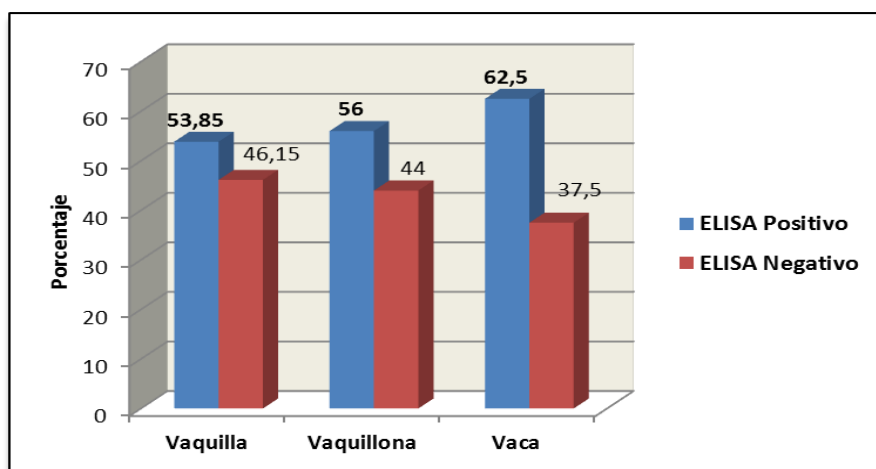


Figura 6 Seroprevalencia de neosporosis por categoría bovina según la prueba ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), en las cuencas lecheras de Tacna, 2014.

Fuente: Tabla 6

Interpretación

Según se observan en la Tabla 6 y Figura 6, se observan al realizar los análisis de las pruebas serológicas mediante el método de ELISA, se aprecia que de las 26 vaquillas, 14 resultaron positivos para *Neospora caninum* con una seroprevalencia de 53,85 %, mientras que para el grupo de 25 vaquillonas, 14 resultaron igualmente positivos, lo que representa una seroprevalencia del 56,00 %. Asimismo, para el grupo de 128 vacas, 80 resultaron positivos para *Neospora caninum*, lo que determina una seroprevalencia del 62,50 %.

Cabe resaltar, que la seroprevalencia de *Neospora caninum* determinada por las pruebas IFI y Elisa es similar en el grupo de vaquillas y vaquillonas, observándose una prevalencia escasamente mayor cuando se utiliza la prueba ELISA en el grupo de vacas.

Tabla 7

Comparativo de resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos *holstein* de las cuencas lecheras de Tacna, 2014.

Categorías	N°	Elisa				IFI			
		+	%	-	%	+	%	-	%
Vaquillas	26	14	12,96	12	16,90	14	12,96	12	16,90
Vaquillonas	25	14	12,96	11	15,49	14	12,96	11	15,49
Vacas	128	80	74,07	48	67,61	79	74,07	48	67,61
TOTAL	179	108	100,00	71	100,00	107	100,00	71	100,00

Fuente: Resultados de laboratorio

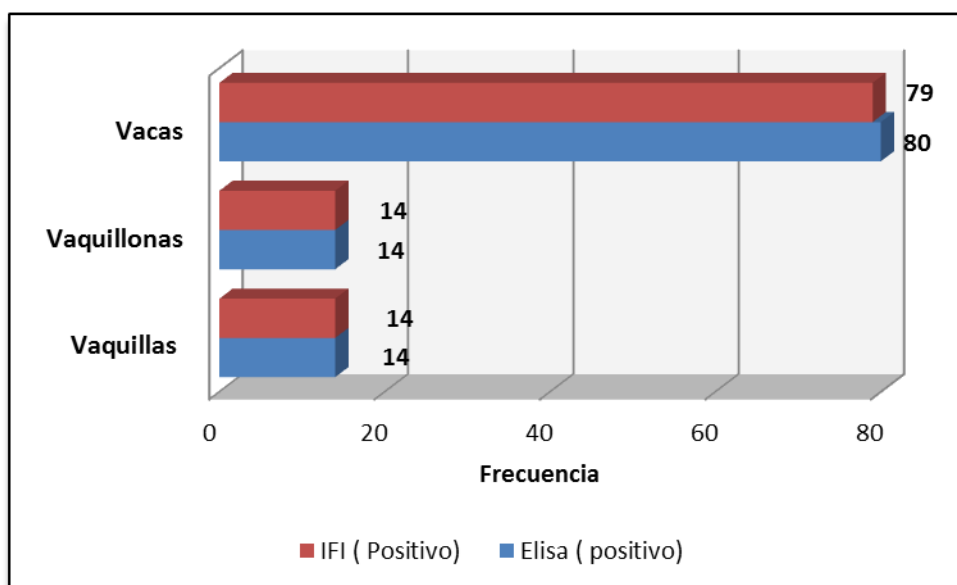


Figura 7 Comparativo de resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos *holstein* de las cuencas lecheras de Tacna, 2014.

Fuente: Tabla 7

Interpretación

En la Tabla 7 y Figura 7, se observan los resultados de las pruebas para neosporosis con resultados positivos y negativos en una muestra de 179 bovinos de las cuencas lecheras de Tacna. Comparativamente, los resultados positivos de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad, son similares cuando se utiliza la

prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) y la prueba inmunofluorescencia (IFI). Se aprecia, una diferencia solo cuando se trata del grupo de vacas (diferencia de 1 en la prueba de Elisa), ya que se encontró 80 resultados positivos cuando se utilizó la prueba de Elisa y 79 cuando se aplica la prueba IFI.

Tabla 8

Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) por categorías en bovinos *holstein* de la cuenca lechera de Sama, 2014.

Categorías	N°	Elisa				IFI			
		+	%	-	%	+	%	-	%
Vaquillas	9	6	10,53	3	14,29	6	17,14	3	13,64
Vaquillonas	8	4	7,02	4	19,05	4	11,43	4	18,18
Vacas	40	26	45,61	14	66,67	25	71,43	15	68,18
TOTAL	57	36	100,00	21	100,00	35	100,00	22	100,00

Fuente: resultados de laboratorio

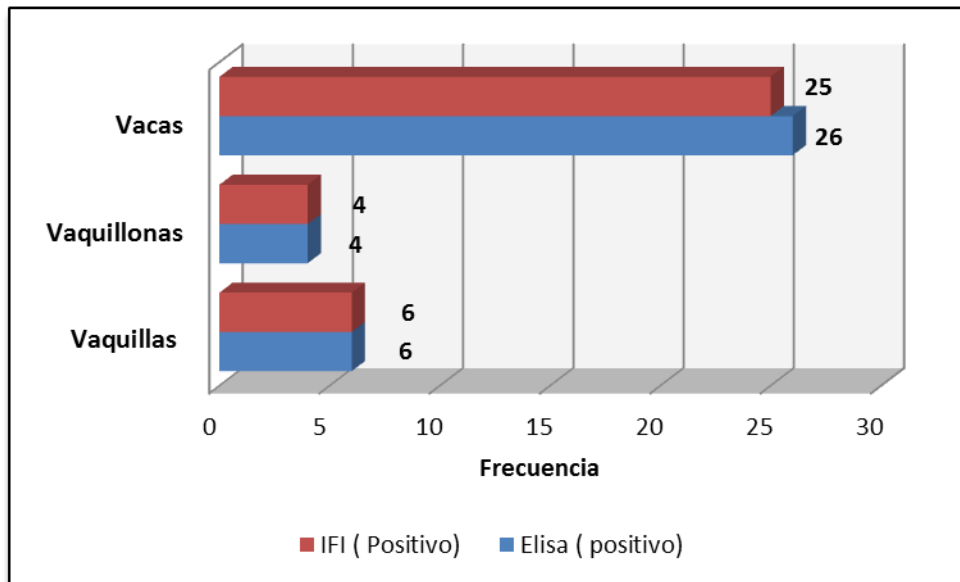


Figura 8 Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos *holstein* de la cuenca lechera de Sama, 2014.

Fuente: Tabla 8

Interpretación

En la Tabla 8 y Figura 8 se observan los resultados de la Neosporosis en bovinos de un total de 57 animales muestreados 40 resultaron positivos que representa el 71,43 % con la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), mientras 26 vacas resultaron

positivos que representa el 45,61 % con la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), en tanto 8 vaquillonas 4 resultaron positivas que representa el 11,43%, 4 vaquillonas resultaron positivas que representa el 7,02 % a la prueba de ELISA, mientras 9 vaquillas 6 resultaron positivas que representa el 17,14 % 6 resultaron positivas que representa el 10,53 % con la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA).

Tabla 9

Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos *holstein* de la cuenca lechera de Ite, 2014.

Categorías	N°	ELISA				IFI			
		+	%	-	%	+	%	-	%
Vaquillas	10	6	11,54	4	16,00	6	11,54	4	16,00
Vaquillonas	11	5	9,62	6	24,00	5	9,62	6	24,00
Vacas	56	41	78,85	15	60,00	41	78,85	15	60,00
TOTAL	77	52	100,00	25	100,00	52	100,00	25	100,00

Fuente: Resultados de laboratorio

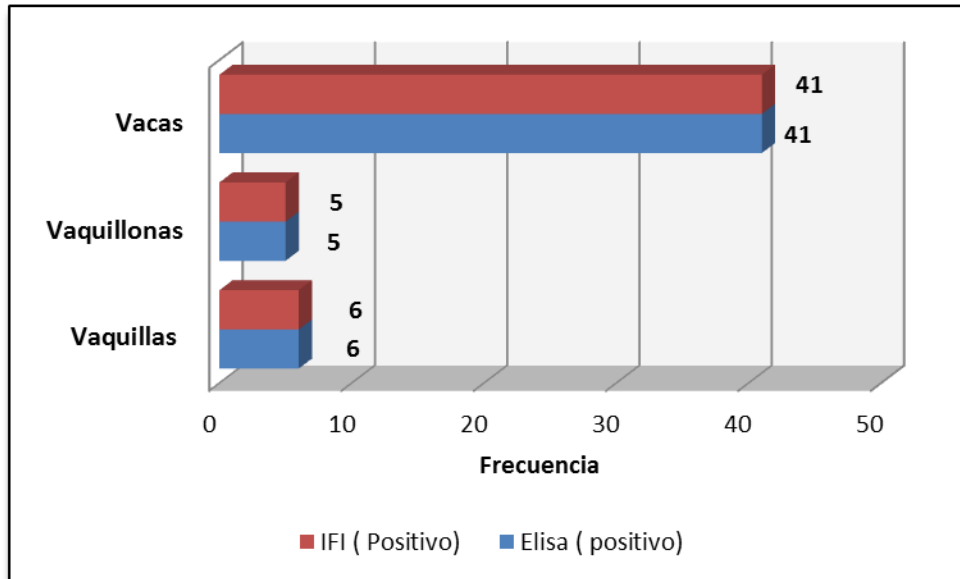


Figura 9 Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos *holstein* de la cuenca lechera de Ite, 2014.

Fuente: Tabla 9

Interpretación

En la Tabla 9 y Figura 9, se observan los resultados de la neosporosis en bovinos de un total de 77 animales muestreados 41 vacas resultaron positivos que representa un 78,85 % con la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) en ambos casos. En tanto de

11 vaquillonas 5 resultaron positivos que representa un 6,62 % con las pruebas de IFI y de ELISA en ambos casos. Mientras de 10 animales muestreados 6 resultaron positivos que representa un 11,54 % con las de IFI y de ELISA en ambos casos.

Tabla 10

Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo Inmunoenzimático ligado a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos *holstein* de la cuenca lechera de Locumba , 2014.

Categorías	N°	Elisa				IFI			
		+	%	-	%	+	%	-	%
Vaquillas	7	2	10,00	5	20,00	2	9,52	5	20,83
Vaquillonas	6	5	25,00	1	4,00	5	23,81	1	4,17
Vacas	32	13	65,00	19	76,00	14	66,67	18	75,00
TOTAL	45	20	100,00	25	100,00	21	100,00	24	100,00

Fuente: Resultados de laboratorio

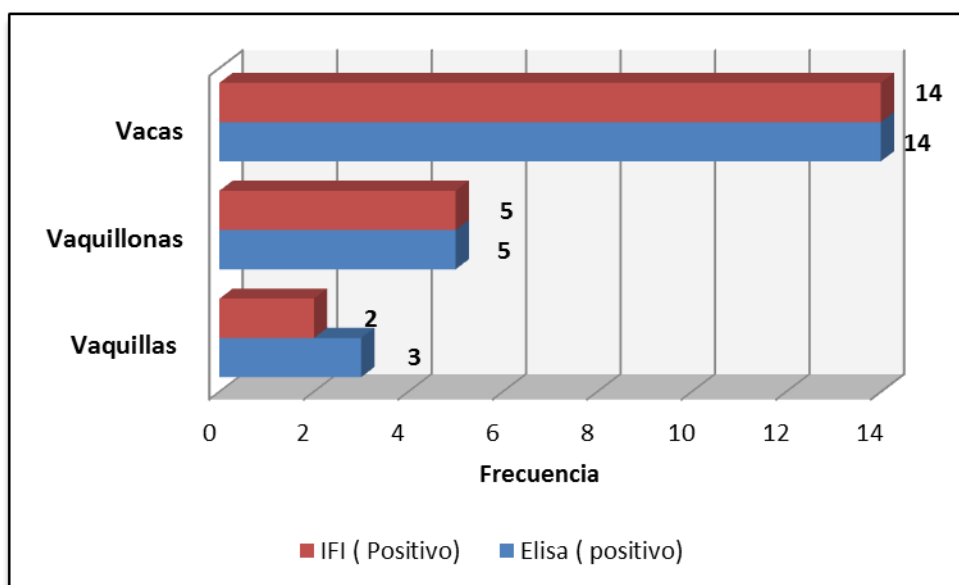


Figura 10 Resultados de análisis de laboratorio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (Elisa) por categorías en bovinos *holstein* de la cuenca lechera de Locumba, 2014.

Fuente: Tabla 10

Interpretación

En la Tabla 10 y Figura 10, se observan los resultados de la neosporosis en bovinos de un total de 45 animales muestreados 14 resultaron positivos que representa el 66,67 % con la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), en tanto 13 resultaron positivos que representa 65,00 % la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a

enzimas, mientras 6 animales muestreados 5 resultaron positivos que representa un 23,81 % con la prueba de (IFI) en tanto 5 resultaron positivos que representa un 25 % con la prueba de (ELISA), en tanto de 7 animales muestreados 2 resultaron positivos que representa 9,72 % con la prueba de (IFI) y 2 resultaron positivos que representa un 10 % a la prueba de (ELISA) .

Tabla 11

Parámetros de valoración de las pruebas diagnóstica de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra la *neospora caninum* en bovinos *holstein*.

De la prueba de IFI

IFI	Neosporosis		TOTAL
	+	-	
+	103	4	107
-	1	71	72
TOTAL	104	75	179

Sensibilidad:	99,04 %
Especificidad:	94,67 %
Valor predictivo positivo:	96,26 %
Valor predictivo negativo:	98,61 %

4.3.1 De la sensibilidad prueba de IFI

$$s(\%) = \frac{VP * 100}{TE}$$

$$s(\%) = \frac{103 * 100}{104}$$

$$s(\%) = 99.04\%$$

S = SENSIBILIDAD

VP = VERDADEROS POSITIVOS

TE = TOTAL ENFERMOS

Una sensibilidad del 99,04 % indica que solo el 99,04 % de los animales enfermos darán positivo la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). En este caso habrá un 0,96 % de falsos negativos, animales enfermos que han dado negativa la prueba.

Cuanto más sensible es una prueba, más probable es que se detecte animales con enfermedad. Por ello, las pruebas con una sensibilidad muy elevada son muy útiles para detectar la presencia de la *Neospora caninum*.

4.3.2 De la especificidad de la prueba de IFI

$$Es(\%) = \frac{VN * 100}{TNE}$$

$$s(\%) = \frac{71 * 100}{75}$$

$$s(\%) = 94,67\%$$

E = ESPECIFICIDAD

VN = VERDADEROS NEGATIVOS

TNE = TOTAL NO ENFERMOS

Una especificidad del 94,67 % indica que el 94,67 % de animales sanos darán negativa la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). De las muestras evaluadas, en este caso habrá un 5,33 % de falsos positivos (pacientes sanos que dan positivo en la prueba).

Las pruebas muy específicas se usan para confirmar la presencia de una enfermedad. Si la prueba es muy específica y da positivo, indica la presencia de la enfermedad, ya que apenas produce falsos positivos.

4.3.3 Del valor predictivo positivo de la prueba de IFI

Valor predictivo positivo:

$$VPP(\%) = \frac{VP * 100}{FP}$$

$$VPP(\%) = \frac{103 * 100}{107}$$

$$VPP(\%) = 96,26\%$$

VPP = VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VP = VALOR POSITIVO

FP = FALSOS NEGATIVOS

Un valor predictivo positivo del 96,26 % indica de cada 100 animales que dan la prueba de inmunofluorescencia indirecta positiva solo el 96,26 % padecen la enfermedad, o lo que es lo mismo, si la prueba da positivo, la probabilidad de padecer la enfermedad es de un 96,26 %. En este caso habrá un 3.74 % de animales sanos diagnosticados

incorrectamente como enfermos a la prueba de inmunofluorescencia indirecta. Pero esto no significa que haya un 3,74 % de falsos positivos.

4.3.4. Del valor predictivo negativo de la prueba de IFI

Valor predictivo negativo:

$$VPN(\%) = \frac{VN * 100}{FN}$$

$$VPN(\%) = \frac{71 * 100}{72}$$

$$VPN(\%) = 98,61\%$$

VPN = VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

VN = VALOR NEGATIVO

FN = FALSOS NEGATIVOS

Un valor predictivo negativo del 98,61 % indica que de cada 100 pruebas negativas, 98,61 % pertenecerán animales sanos, o lo que es lo igual, si la prueba de inmunofluorescencia indirecta da negativa, la probabilidad de no padecer la enfermedad es del 98,61 %. En este caso hay un 1,39 % de animales enfermos que serán diagnosticados erróneamente

como no enfermos. Esto tampoco significa que haya un 1,39 % de falsos negativos

De la prueba de ELISA

Tabla 12

ELISA	Neosporosis		TOTAL
	+	-	
+	102	6	108
-	2	69	71
TOTAL	104	75	179

Sensibilidad : 98,08 %

Especificidad : 92,00 %

Valor predictivo positivo : 94,44 %

Valor predictivo negativo : 97,18 %

4.3.5. De la sensibilidad de la prueba de ELISA

Sensibilidad:

$$s(\%) = \frac{VP * 100}{TE}$$

$$s(\%) = \frac{102 * 100}{104}$$

$$s(\%) = 98,08\%$$

S = SENSIBILIDAD

VP = VERDADEROS POSITIVOS

TE = TOTAL ENFERMOS

Una sensibilidad para la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (ELISA) de 98,08 %, nos indica que solo el 98,08 % de los animales enfermos fueron diagnosticados positivamente con la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas indirecta. De las muestras evaluadas en este caso el 1,92 % de falsos negativos enfermos han dado negativo a la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas

indirecta. Cuanto más sensible es una prueba, más probable es que detecte animales con enfermedad. Por ello las pruebas con una sensibilidad muy elevada son muy útiles para detectar la presencia de la *Neospora caninum*.

4.3.6. De la especificidad de la prueba de ELISA

Especificidad:

$$Es(\%) = \frac{VN * 100}{TNE}$$

$$Es(\%) = \frac{69 * 100}{75}$$

$$Es(\%) = 92,00\%$$

E = ESPECIFICIDAD

VN = VERDADEROS NEGATIVOS

TNE = TOTAL NO ENFERMOS

Una especificidad para la prueba ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas indirecta (ELISA) de 92 % nos indica que solo el 92 % de los animales sanos fueron diagnosticados negativamente con la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas. De las muestras evaluadas,

en este caso habrá un 8 % de falsos positivos animales sanos que han dado positivo la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas.

Las pruebas muy específicas se usan para confirmar la presencia de una enfermedad. Si la prueba es muy específica da positivo, lo que indica la presencia de la enfermedad, ya que apenas produce falsos positivos.

4.3.7. Del valor predictivo positivo de la prueba de ELISA

Valor predictivo positivo:

$$VPP(\%) = \frac{VP * 100}{FP}$$

$$VPP(\%) = \frac{102 * 100}{108}$$

$$VPP(\%) = 94,44\%$$

VPP = VALOR PREDICTIVO POSITIVO

VP = VALOR POSITIVO

FP = FALSOS NEGATIVOS

Un valor predictivo positivo para la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas fue del 94,44 %, que de cada 100 animales enfermos que darán la prueba positivo solo el 94,44 % padecen

la enfermedad, o lo que es lo mismo, si la prueba da positivo, la probabilidad de padecer la enfermedad es de un 94,44%.

En este caso habrá un 5,56 % de animales sanos diagnosticados incorrectamente como enfermos a la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas (ELISA), pero esto no significa que haya un 5,56 % de falsos negativos.

4.3.8. Del valor predictivo negativo de la prueba de ELISA

Valor predictivo negativo:

$$VPN(\%) = \frac{VN * 100}{TN}$$

$$VPN(\%) = \frac{169 * 100}{71}$$

$$VPN(\%) = 97,18\%$$

VPN = VALOR PREDICTIVO NEGATIVO

VN = VALOR NEGATIVO

FN = FALSOS NEGATIVOS

Un valor predictivo negativo para la prueba ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas fue del 97,18 % indica que de cada 100 pruebas negativas, 97,18 % pertenecerán a animales sanos, o lo que es igual, si la prueba da negativo, la probabilidad de no padecer la enfermedad es del 97,18 %, en este caso hay un 2,82 % de animales enfermos que serán diagnosticados erróneamente como no enfermos a la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas. Esto tampoco significa que haya un 2,82 % de falsos negativos a la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas indirecta (ELISA).

4.3.9. De las razones de verosimilitud

Tabla 13

Sensibilidad especificidad para la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

		Neosporosis bovina		
		Enfermo (E+)	No enfermo(E-)	
Prueba de IFI	Positiva (T +)	103	4	Positivos :107
	Negativa (T-)	1	71	Negativos:72
	Total	104	75	179

Fuente: Resultados de laboratorio

Sensibilidad : 99,04 %
 Especificidad : 94,67 %
 Valor predictivo positivo : 96,26 %
 Valor predictivo : 98,61 %
 negativo

Tabla 14

**Sensibilidad especificidad para la prueba de ensayo
 inmunoenzimático ligada a enzimas (ELISA)**

		Neosporosis bovina		
		Enfermo (E+)	No enfermo (E-)	
Prueba	Positiva (T +)	102	6	Positivos :108
de	Negativa (T-)	2	69	Negativos:71
ELISA				
	Total	104	75	179

Fuente: Resultados de laboratorio

Sensibilidad : 98,08 %
 Especificidad : 92,00 %
 Valor predictivo positivo : 94,44 %
 Valor predictivo negativo : 97,18 %

Tabla 15

Intervalos de confianza de la sensibilidad y especificidad para la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

	Valor estimado	Intervalo de confianza al 95 % (IC)	
Sensibilidad	0,99	96,69	100,00
Especificidad	0,94	98,91	100,00
CP (+)	18,57	92,20	100,00
CP (-)	0,01	95,21	100,00

Fuente: Resultados de laboratorio

Tabla 16

Intervalos de confianza de la sensibilidad y especificidad para la prueba de ELISA

	Valor estimado	Intervalo de confianza al 95 % (IC)	
Sensibilidad	0,98	94,96	100,00
Especificidad	0,92	85,19	98,81
CP (+)	12,26	89,66	99,29
CP (-)	0,02	92,63	100,00

Fuente: Resultados de laboratorio

Interpretación

Según se observa en la tabla 15 y 16, la razón de verosimilitud de la prueba de inmunofluorescencia Indirecta (IFI) positiva (CP+) es de 18,57 con un intervalo de confianza que va desde 92,20 – 100,00, mientras que la razón de verosimilitud de la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas Indirecta (ELISA) es de 12,26; con un intervalo de confianza que va desde 89,66 – 99,29, siendo mayor el valor para la primera prueba, lo que indica una mejor capacidad para diagnosticar la presencia de la neosporosis bovina.

Respecto a las razones de verosimilitud negativa (CP-), se halló un cociente de probabilidad negativo de 0,01, con un intervalo de confianza que va desde 95 - 21 para la prueba de inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y de 0,02, con un intervalo de confianza que va desde 92,63 – 100,00 para la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA), lo que indica para el caso de la primera prueba una mejor capacidad para diagnosticar la ausencia de la neosporosis bovina.

4.4. Percepción de los ganaderos respecto a la neosporosis y sus consecuencias

Tabla 17

Prevalencia de aborto en vaquillonas y vacas de la raza *Holstein* en cuencas lecheras de Tacna, 2014.

Aborto	Vaquillonas		Vacas	
	N°	%	N°	%
Con aborto	18	56,00	103	50,46
Sin aborto	7	44,00	25	49,54
Total	25	100,00	128	100,00

Fuente: Elaboración propia

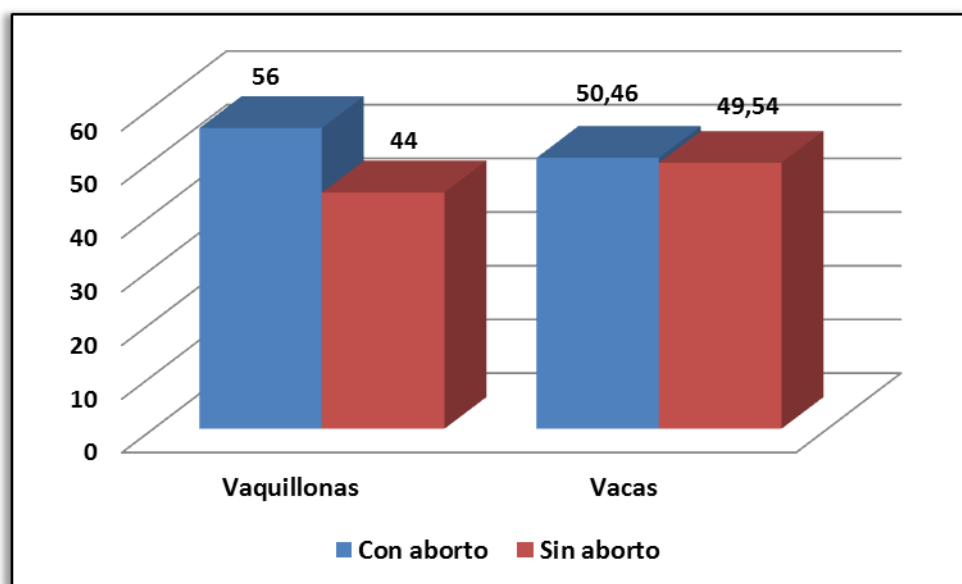


Figura 11 Prevalencia de aborto en vaquillonas y vacas de la raza *holstein* en cuencas lecheras de Tacna, 2014

Fuente: tabla 17

En la Tabla 17 y Figura 11, se observan que los productores de las zonas de estudio, manifestaron que de las 128 vacas que conformaron la muestra, prácticamente la mitad (50,46 %) presentaron algún episodio de aborto, la diferencia no presentó el evento. En el caso de las 25 vaquillonas estudiadas, un poco más de la mitad (56,00 %) igualmente presentó en algún momento aborto.

Tabla 18

Posible vía de transmisión de la *Neospora caninum* en bovinos de la raza *holstein* según percepción de los productores de las cuencas lecheras de Tacna, 2014.

	N°	%
Vertical	108	60,34
Horizontal	71	39,66
Total	179	100,00

Fuente: Elaboración propia

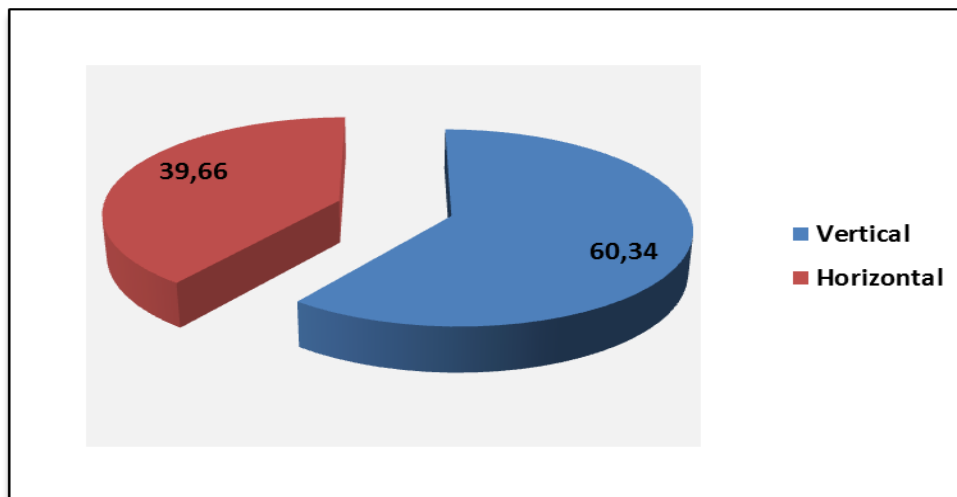


Figura 12 Posible vía de transmisión de la *Neospora caninum* en bovinos de la raza *holstein* según percepción de los productores de las cuencas lecheras de Tacna, 2014.

Fuente: tabla 18

En la tabla 18 y figura 12 se observan, la posible vía de transmisión de la *Neospora caninum* según manifestación de los

productores de bovinos, apreciándose que de un total de 179 animales muestreados, el 60,34 % de los ganaderos indican que la vía de contagio en el caso de sus animales, fue la vía vertical, es decir, de madre a cría o vía placentaria. De otro lado, un 39,66 % considera que la vía de contagio fue horizontal, es decir, a través de alimento contaminado (pasto y agua).

Tabla 19

Destino de la placenta de vacunos de la raza *holstein* en las cuencas lecheras de Tacna, 2014.

	N°	%
Se entierra	95	53,10
Comida para perro	28	15,60
Ignora el destino	30	16,80
Total	153	100,00

Fuente: Cuestionario

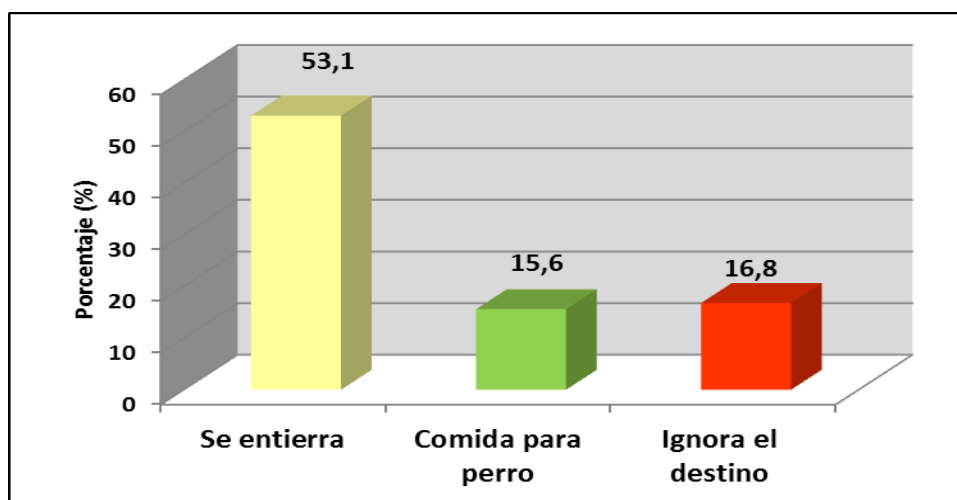


Figura 13 Destino de la placenta de vacunos de la raza holstein en las cuencas lecheras de Tacna, 2014.

Fuente: tabla 19

Interpretación

En la Tabla 19 y Figura 13, se aprecia el destino que se le ha dado a la placenta. Más de la mitad de los productores (53,10 %) indican que la placenta se entierra a una profundidad máxima de un metro en las zonas aledañas a su predio; el 15,60 % manifiesta que lo destina como alimento para los perros, mientras que el 16,80 % ignora el destino que se le dio a la placenta.

Tabla 20

Aborto según tercio en vaquillonas y vacas de la raza *holstein* de las cuencas lecheras de Ite, Sama y Locumba, 2014.

Tercio de Aborto	Vaquillonas		Vacas	
	N°	%	N°	%
Primer tercio	5	20,00	34	26,56
Segundo tercio	9	36,00	44	34,38
Tercer tercio	11	44,00	50	39,06
Total	25	100	128	100

Fuente: Cuestionario

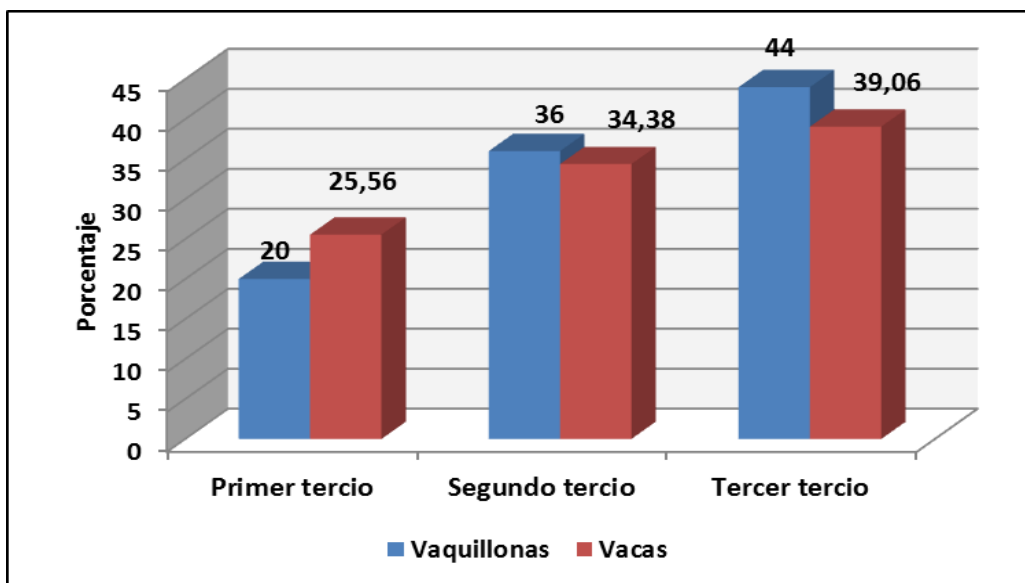


Figura 14 Aborto según tercio en vaquillonas y vacas de las cuencas lecheras de Ite, Sama y Locumba, 2014.

Fuente: tabla 20

Interpretación

Según se observa en la tabla 20 y figura 14, se observan los 25 casos de vaquillonas de la raza holstein que presentaron abortos, el 44 % ocurrió en el tercer tercio de gestación, un poco más de la tercera parte con un 36%, en el segundo tercio de gestación, la diferencia que corresponde a la quinta parte con un 20 % en el primer tercio. De igual forma, en el caso de las vacas de la raza holstein, se presentaron 128 casos de abortos, de los cuales el 39,06 % también ocurrió en el tercer

tercio de la gravidez, una proporción cercana que equivale a un poco más de un tercio con un 34,38 % en el segundo tercio, la diferencia que corresponde a un poco más de la cuarta parte con el 26,56 % ocurrió en el primer tercio de la gestación.

Tabla 21

Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según conocimiento de la existencia de la *Neospora Caninum* como causa de aborto, 2014.

	N°	%
Si	118	65,92
No	61	34,08
Total	179	100,00

Fuente: Cuestionario

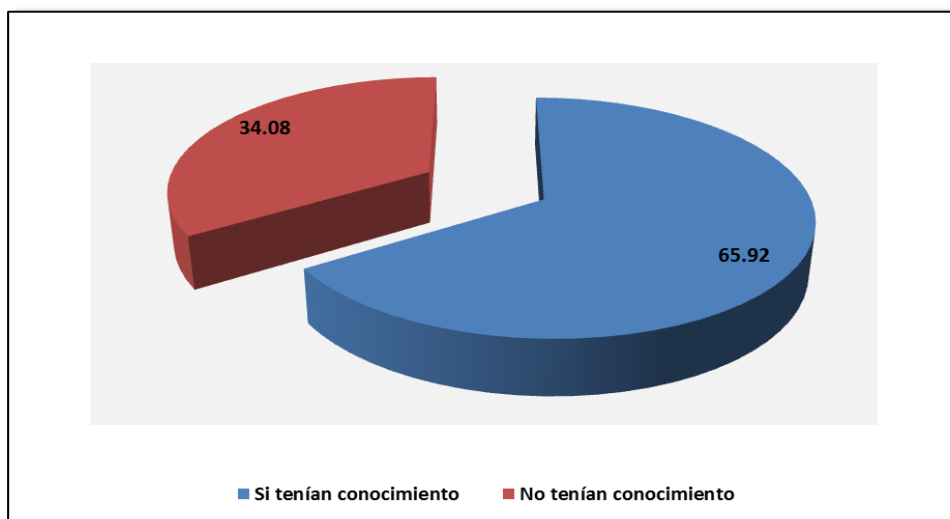


Figura 15 Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según conocimiento de la existencia de la *Neospora Caninum* como causa de aborto, 2014.

Fuente: tabla 21

Interpretación

Según se observa en la tabla 21 y figura 15, al preguntársele a los ganaderos de las cuencas lecheras sobre la existencia de la *Neospora caninum* como causa de aborto, prácticamente las dos terceras partes (65,92%) asistieron y dijeron que *si tenían conocimiento de la existencia del parásito llamado Neospora caninum*, sin embargo, un 34,08 % desconocía la existencia del parásito mencionado.

Tabla 22

Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según si realizan buenas prácticas sanitarias para prevenir la transmisión de la *Neospora Caninum*, 2014.

	N°	%
Si	114	63,69
No	65	36,31
Total	179	100,00

Fuente: Cuestionario

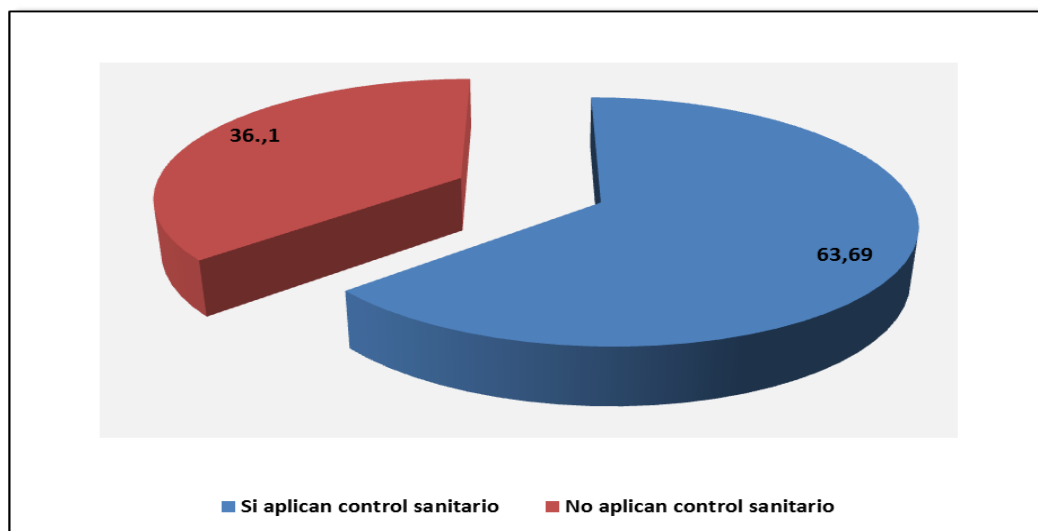


Figura 16 Ganaderos de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama de Tacna, según si realizan buenas prácticas sanitarias para prevenir la transmisión de la *Neospora Caninum*, 2014.

Fuente: tabla 22

Interpretación

Según se aprecia en la tabla 22 y figura 16, al preguntársele a los ganaderos de las cuencas lecheras si aplican buenas prácticas sanitarias para prevenir la transmisión de la *Neospora Caninum* como causa de aborto, el 63,69 % manifestaron que *sí realizan el control sanitario de sus rebaños, a fin de prevenir la enfermedad*, en contraste, el 36,31 % no realiza ninguna práctica sanitaria, lo que resulta preocupante.

4.5. Contrastación de hipótesis

Ho: La prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas indirecta (ELISA) presenta valores similares de sensibilidad y especificidad que la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos *holstein*

H1: La prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas indirectas (ELISA) presenta valores superiores de sensibilidad y especificidad que la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos *holstein*

Tabla 23

CURVA ROC

Curva	Área ROC	EE (De Long)	IC (95%)	
1	0,500	0,271	0,4469	0,5531
2	0,500	0,000	0,5000	0,5000

Prueba de homogeneidad de áreas

Ji cuadrado: 0,000

Gl. 1

Valor P: 1.000

Interpretación: Dado que el valor P es mayor a 0,05 no se rechaza la hipótesis nula, es decir, se concluye que ambas pruebas son similares.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

5.1 Describir el comportamiento epidemiológico de la neosporosis bovina por cuencas lecheras según categorías

5.1.1 Por categorías

En el presente estudio, comprendió una muestra de 179 bovinos de la raza Holstein, de los cuales 128 fueron vacas, 26 vaquillas y 25 vaquillonas de las cuencas lecheras de Locumba, Ite y Sama. En general, se encontró 49 bovinos con resultado positivo y una seroprevalencia de 27,37 % con la prueba IFI, mientras que con la prueba de ELISA, se encontró 44 bovinos con resultado positivo y una seroprevalencia de 24,58 %.

Lo cual indica que más de la mitad de la población de la cuenca lechera de Tacna, presenta esta enfermedad por categorías. Nuestros resultados tienen similitud con los reportados por (9) con una seroprevalencia de 47,82 % en el distrito de Inclán – Sama región Tacna. (10) quien encontró una seroprevalencia de 44,30 % en el distrito de Ite –

Tacna. En la provincia de Mariscal Nieto – Moquegua (30) quien encontró una seroprevalencia de 50,96%. Los resultados encontrados son similares y corroboran con nuestros resultados, esto se debe principalmente a que la enfermedad de neosporosis está muy difundida en nuestro país y región debido al manejo, así también en casi todos los hatos presenta casos positivos a la enfermedad. Además de un deficiente control sanitario en los hatos lecheros y debido también a la introducción de animales de zonas con alta prevalencia de la enfermedad sin un diagnóstico serológico. Se debe a que en estos lugares de estudio existe una escasa o esporádica introducción de animales de reemplazo, a la ausencia del hospedero definitivo y debido a la inaccesibilidad de los lugares. Por otro lado, existe discordancia con los resultados encontrados por (8) una seroprevalencia de 23,00% en el distrito de Inclán – Tacna, de igual forma los resultados encontrados por (27); quien encontró un 18,10% de seroprevalencia en la provincia de Melgar – Puno.

A nivel nacional la actividad serológica revela valores reportados por (6) una seroprevalencia de 29,61% en bovinos lecheros del valle de Lima. La zona norte del valle presentó una prevalencia de 42,08% + 8,83%, mientras que la zona sur del valle de Lima reportó una prevalencia de 22,96% + 6,08% (6). Nuestro país es altamente seroprevalente, llegando a valores del 43,00% en Cajamarca (5) 57,00% en Arequipa (12)

y 40,00% en Amazonas (7) (62) reportaron una prevalencia de 12,40% en la Sociedad Agrícola de Interés Social (SAIS – Junín).

En el país, la mayoría de investigaciones relacionada con seroprevalencias de *Neospora caninum* han sido realizadas en explotaciones de tipo intensiva establecidas en la costa peruana (38). Estudios recientes indican que el *Neospora caninum* se viene convirtiendo en un agente parasitario de gran importancia en el Perú. Según los estudios de prevalencia realizados en la diversas cuencas lecheras de Tacna (11).

A nivel latinoamericano reportó una seroprevalencia de 10,20% en Córdoba – Colombia reportó una prevalencia de 15,20% en vacas en la región de Chile (38) reportó una seroprevalencia de 56,00% en México. En otros países de Sudamérica también se confirmó la presencia del parásito, reportándose prevalencias de 14,09% en Brasil y de 56,90% en Argentina (22) y 42,00% en la zona centro – norte de Ecuador (23).

Estas discordancias se deben probablemente a las diferencias en el manejo, tipo de explotación y sobre todo a mayor control sanitario, así mismo a la eliminación del hospedero definitivo.

En el continente americano, Estados Unidos de Norteamérica reportó una prevalencia que va desde 21,70% a 38,00% (12), Canadá reportó una prevalencia de 21,90% (20).

A nivel europeo (14) en España reportó una prevalencia de 30,60%, Suecia reportó una prevalencia de 2,00% (12), Holanda mostró una prevalencia de 51,50%(16) Francia reportó una prevalencia de 26,00%, Taiwán reportó una prevalencia de 44,90% (18).

En el continente oceánico reportó Australia una prevalencia de 24,00% (19) (3) reportó una seroprevalencia del 59,00% en Escocia.

Esto nos indica que los animales en estas zonas de estudio, han sido expuestos al parásito y ello se originó por la introducción de animales infectados, episodios de aborto y consecuente presencia de perros infectados o cánidos salvajes, el desconocimiento de la enfermedad por parte de los propietarios, lo cual estaría directamente relacionado con la epidemiología del parásito.

5.2 Determinar los parámetros de valoración de las pruebas diagnóstica de inmunofluorecencia indirecta (IFI) y la prueba de ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en bovinos holstein

Resultados encontrados en el presente trabajo de investigación, donde se obtuvo de un total de 107 animales muestreados, 103 resultaron positivos y 4 negativos a la prueba de (IFI) con una sensibilidad de 99,04%, especificidad 94,67%, valor predictivo positivo 96,26% y valor predictivo negativo de 98,61% con una razón de verosimilitud positiva (CP+) 18,57% con un intervalo de confianza de 92,20 – 100,00, en tanto la razón de verosimilitud negativa (CP-) de 0,01%, lo que indica que un 99,04 % de los animales enfermos dieron positivo a la prueba de (IFI), en tanto 0,96 % de falsos negativos a la prueba, es decir cuánto más sensible es una prueba más probable, es que de detecte animales enfermos, por ello las pruebas con una sensibilidad muy elevada son muy útiles para detectar la presencia de la *Neospora canina*, mientras con la prueba de (ELISA) se obtuvo de un total de 108 animales 102 resultaron positivos y 6 negativos a la prueba de (ELISA) con una sensibilidad de 98,08%, especificidad 92,00%, valor predictivo positivo 94,44% y valor predictivo negativo 97,18% con una razón de verosimilitud positiva de

(CP+) 12,26% con un intervalo de confianza de 89,66 – 99,29, en tanto la razón de verosimilitud negativa (CP-) de 0,02%, lo que indica que un 98,08 % de los animales enfermos dieron positivo a la prueba de (ELISA), en tanto 1,92 % de falsos negativos han dado negativo a la prueba, o sea cuanto más sensible es una prueba, más probable es que detecte animales con la enfermedad de la *Neospora caninum*. En tanto nuestro resultados son diferentes a los reportados por (38) una sensibilidad de 82,40% a 97,00%, especificidad de 85,70% a 90,00% para maximizar la sensibilidad se utilizó la prueba de (IFI) con una dilución de 1: 200, en tanto la prueba de (ELISA) reportó niveles mayores de sensibilidad y especificidad, basadas en el uso de taquizoitos completos, sin embargo estudios recientes en europa sobre neosporosis revela prevalencias de de 63,00% con intervalos de confianza de 55,00%, 57,00% 69,00% en ganado lechero en España, estas prevalencias son más elevadas comparadas con países europeos como Holanda, Alemania o Suecia. Donde la prevalencia animal real fue la más elevada 16,20% con intervalo de confianza de 95,00%, 14,90%y 17,50% con elevadas variaciones entre rebaños. Estos resultados son mayores a los reportados por (32), valor predictivo positivo 52,94%, valor predictivo negativo 40,00% para la prueba de (IFI), puede ser debido a las tasas de transmisión vertical a lo

largo del tiempo en cada rebaño, por reposición de animales procedentes de madres seropositivas.

Asimismo otros estudios con la prueba de (ELISA), encontró el valor predictivo positivo de cada uno de los test (ELISA) comparada con la (IFI) presento un valor predictivo de los animales positivo con 52,94%, el valor predictivo negativo en referencia a la (IFI) fue del 40,00%, sin embargo uno de los principales problemas en el diagnóstico serológico ha sido la falta de concordancia entre las diferentes técnicas serológicas (59).

5.3 Identificar la percepción de los ganaderos respecto a la neosporosis y sus consecuencias

5.3.1 De la presencia del aborto

Resultados encontrados en el presente trabajo de investigación donde se obtuvo una seroprevalencia, en cuanto a la presencia de aborto, en la categoría vaquillona 56,00% y 50,46% en la categoría vaca, nuestros resultados tienen similitud con los reportados por (10) quien encontró una seroprevalencia de 51,16%, esta diferencia probablemente se atribuye a la presencia del parásito o a la contaminación del mismo originando infecciones crónicas en la hembra gestante (1).

Es importante indicar que la infección por *Neospora caninum* se presenta con mayor frecuencia en los rebaños con problemas de aborto y mortalidad neonatal que en las explotaciones sin antecedentes de fallo reproductivo (56) esto afirma que las vacas con anticuerpos a *Neospora caninum* tienen mayor riesgo de aborto que aquellas seronegativas (41).

5.3.2 Posibles vías de transmisión

En cuanto a las posibles vías de transmisión de la *Neospora caninum*, los resultados encontrados fueron por la vía vertical (transplacentaria endógena) con una seroprevalencia de 60,34% y 39,66% la vía horizontal (transplacentaria exógena), nuestros resultados tienen similitud con los reportados por (10) donde encontró que la vía de transmisión es la vertical con una seroprevalencia de 51,37%, como indica que la principal vía de infección en el ganado bovino, siendo la forma de propagación y mantenimiento de la enfermedad la transmisión de madre a hija sugerida como la principal vía por varios autores(47).

Asimismo una vez adquirida la infección (Útero o desde el medio), los animales permanecen infectados probablemente de por vida y pueden transmitir la infección a su descendencia en distintas gestaciones, consecutivas o no con porcentajes que oscilan entre el 50,00% y el 95% (46).

Otras vías de transmisión la lactogénica, un reciente estudio, evidenció la presencia de ADN de *Neospora caninum* en el calostro de vacas seropositivas, lo cual implica la posibilidad de transmisión a través del calostro (43). Asimismo, estudios experimentales han demostrado que terneros neonatales pueden infectarse por la ingestión de la leche conteniendo taquizoítos (44).

5.3.3 Destino de la placenta

En cuanto al destino del feto y placenta, se encontró una seroprevalencia de 53,10% para el caso en que entierran y 16,80% para el caso en que ignora el destino de la placenta y 15,60% en el caso que dan comida al perro, los resultados encontrados en el presente estudio guardan similitud con los reportados por (44). Como se indican los productos de la gestación, a veces son atendidos por los ganaderos, pero en otras ocasiones simplemente los echan a la basura ante la presencia del hospedero definitivo (perros, zorros), estos suelen llevarse la placenta o el feto.

Todos estos casos se presentan por desconocimiento de la enfermedad, en algunos casos los ganaderos dejan a la intemperie los restos del parto o se los ofrecen al hospedero definitivo. La presencia de

perros y cánidos salvajes es alta en los rebaños reportados por (10) una seroprevalencia de 84,16% en el caso de cánidos salvajes.

Además una vez detectada la infección se debe reducir la exposición de perros a tejidos infectados por el parásito, es importante llevar a cabo estrictas medidas de higiene durante las épocas de parto, también se observa que existe una mayor prevalencia de infección en hatos donde hay perros presentes como indica (16).

5.3.4 Presentación del aborto

En cuanto al tercio de gestación en que se produce el aborto, los resultados encontrados en el presente estudio, muestran en el tercer tercio de gestación una seroprevalencia de 44,00% en la categoría de vaquilla y 39,06% en vacas. Nuestros resultados son similares a los reportados por (10), donde podemos observar una seroprevalencia superior en el segundo tercio de gestación con 53,13%, nuestros resultados son diferentes con lo reportado por (33) quien indica que la presencia de aborto ocurre entre los 90 y 240 días de gestación, alcanzó un máximo a los 150 – 210 días (36) de gestación y posteriormente un descenso antes del parto.

Asimismo indica que la tasa de aborto fue mayor en el segundo trimestre, también comparada con la tasa en el tercer trimestre, es decir, que durante el segundo trimestre la inmunodepresión de la respuesta celular o el fallo de la madre en producir una adecuada respuesta inmune.

Nuestros resultados indican que la presencia de anticuerpos frente *Neospora caninum* en el ganado vacuno pueden utilizarse como indicador de aborto en los animales tras los 100 días de gestación y dada la similitud con otros estudios sobre aborto causada por neospora (36) (1) indican una gran consistencia de la patogénesis del aborto causado por Neospora en diferentes condiciones de manejo y sistema productivo en el mundo.

5.3.5 Nivel de conocimiento de la *neospora caninum*

En cuanto al conocimiento de la existencia de la *Neospora caninum* como causa de aborto, los resultados encontrados en el presente estudio, indican que sí tenían conocimiento, con una seroprevalencia de 65,92% y 34,08% que no tenían conocimiento, estos resultados guardan similitud a los reportados por autores en diferentes regiones ganaderas del mundo (1).

La Neosporosis, en la actualidad es considerada como una de las principales causas de aborto y mortalidad neonatal en el ganado vacuno lechero en diversos países (1).

El papel de este agente etiológico como causal de abortos en el ganado vacuno es de suma importancia (16) ya que puede presentarse de forma epidémica o endémica en un hato (47).

5.3.6 Realizan buenas prácticas sanitarias

En cuanto si realizan buenas prácticas sanitarias para prevenir la transmisión de la *Neospora caninum*, los resultados encontrados en el presente estudio, indican que sí realizan buenas prácticas. Se encontró una seroprevalencia de 63,69% y 36,31% que no realizan prácticas, dentro de las prácticas sanitarias, el control de infecciones congénitas realizan exámenes serológico a las hembras para reposición (38) eliminan las vacas infectadas.

Si hay aborto por segunda vez es preferible descartar al animal (38), control de posibles transmisiones post natales, restringir el acceso de mascotas a los almacenes de alimentos, eliminar las placentas, enterrar los fetos abortados (12), medidas profilácticas, prevenir la enfermedad mediante el uso de vacunas inactivadas (4).

CONCLUSIONES

Primera.- El comportamiento epidemiológico de la neosporosis bovina en las cuencas lecheras de la región Tacna, según categorías, se caracteriza, por presentar resultados positivos, en la cuenca de Sama, tanto para la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) como la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas indirectas (ELISA), en la categoría de vaquillas (6 con resultado positivo); vaquillonas (4 con resultado positivo); sin embargo, se aprecia una diferencia de un caso en la categoría de vacas IFI: (25 casos positivos) y (ELISA) (26 con resultado positivo). En la cuenca de Ite, los casos positivos son similares en la categoría de vaquillas (6 con resultados positivo); vaquillonas (5 con resultado positivo) y vacas (41 con resultado positivo). En la cuenca de Locumba, los casos positivos son equivalentes en la categoría de vaquillas (2 con resultado positivo); vaquillonas (5 con resultado positivo); mientras que en la categoría de vacas (13 con resultado positivo) a la prueba de (ELISA) (14 con resultado positivo). En general, la prevalencia de Neospora en bovinos *holstein de* las cuencas lecheras de Tacna, es de 53,85% para las vaquillas; 56,00 % para las vaquillonas y 62,50% para las vacas.

Segunda.- Los parámetros de valoración de la prueba diagnóstica para *Neospora caninum* en bovinos *holstein* según la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzima indirecta (ELISA) fueron: sensibilidad 98,08%, especificidad 92,00 %; valor predictivo positivo 94,44 % y valor predictivo negativo 97,18%, la razón de verosimilitud positiva fue de 94,44 % y la razón de verosimilitud negativo 97,18 %. Para la prueba inmunofluorescencia Indirecta (IFI), la sensibilidad fue de 99,04%, especificidad 94,67 %; valor predictivo positivo 96,26% y valor predictivo negativo 98,16 %.

La razón de verosimilitud positiva fue de 18,57% con un intervalo de confianza que va desde el 92,20 – 100,00 y la razón de verosimilitud negativa fue 0,01 con un intervalo de confianza que va desde 95,21 – 100,00 para la prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI); y la razón de verosimilitud positiva fue de 12,26% con un intervalo de confianza que va desde 89,66 – 99 - 29 y la razón de verosimilitud negativa fue de 0,02 con un intervalo de confianza que va desde 92,63 – 100,00 para la prueba de ensayo inmunoenzimático ligada a enzimas indirecta (ELISA).

Tercera.- La percepción de los ganaderos respecto a la neosporosis bovina por cuencas lecheras de Tacna, según la presencia de aborto una seroprevalencia de 56,00% en la categoría vaquillas, la vía

de transmisión fue la vertical con una seroprevalencia de 60,34%, el destino del feto y placenta con una seroprevalencia de 53,10% en el caso que entierran; en cuanto al tercio de aborto la seroprevalencia fue 49,00% en la categoría vaquilla; con una seroprevalencia de 65,92% que sí tienen conocimiento; una seroprevalencia de 63,69% que sí realizan práctica sanitaria.

RECOMENDACIONES

A los profesionales relacionados con la producción animal y afines se recomienda:

Primera: Utilizar los conocimientos generados en el presente estudio en sus labores de asistencia técnica sobre la neosporosis en beneficio de los criadores de ganado bovino de las cuencas lecheras de Tacna.

Segunda: Que, en base a los resultados hallados en el presente estudio, considerar el comportamiento epidemiológico de la Neosporosis bovina, la sensibilidad y especificidad para la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum*, mediante las pruebas serológicas aplicadas en el presente estudio.

Tercera: Continuar con investigaciones en relación a la presente línea de investigación, para validar otras técnicas como el PCR el RIA (*Radio inmuno Análisis* o Radio Inmuno Ensayo) e incrementar las probabilidades de éxito en el uso práctico de dichos parámetros, que identificar los patrones genéticos de la *Neospora caninum*.

A los estudiantes de las Facultades de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ciencias Agrarias y afines se recomienda

Cuarta: Aplicar el conocimiento generado en el presente estudio, sobre la detección de anticuerpos contra la *Neospora caninum* en ganado bovino, para evitar se susciten tales fenómenos en las condiciones actuales del sistema de crianza de las cuencas lecheras de Tacna, y así mejorar, prevenir y controlar enfermedades que incrementan la morbilidad y mortalidad en el ganado bovino.

Quinto: Realizar trabajos de investigación similares en otras razas bovinas como la *Jersey*, que se cría en las cuencas lecheras de Tacna, a fin de caracterizar su perfil epidemiológico-

Sexta: Realizar trabajos de investigación aplicando otras técnicas como el RIA (Radio inmuno Análisis) para crear un corpus cognoscitivo sobre la neosporosis bovina.

A los criadores de ganado lechero de la raza *Holstein*:

Séptima: Aplicar las recomendaciones técnicas recomendadas por los profesionales de las ciencias veterinarias, acerca de la neosporosis bovina, para prevenir y controlar la infestación por neospora en sus hatos ganaderos y por ende mejorar la producción y productividad del ganado bovino.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dubey, J. P., Carpenter, J. I., Speer, C. A., Y A. Uggla. (2002). Newly recognized fatal disease of dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc.
2. Conraths FJ; G. Schares. (2004). Diagnósis and epidemiology of Neospora caninum- associated abortions in cattle.
3. Buxton D, (2002). The comparative pathogenesis of neosporosis.
4. Björkman, C.; Johansson O, Stenlund S, (2000). Neospora species infection in a herd of dairy cantle.
5. Cabrera, M.; P (2000). Evidencia serológica de infección por Neospora caninum en ganado vacuno en Perú. Res. IV Congreso Peruano de Parasitología.
6. Silva, P.; A. Chávez; H. Rivera; E. Casas. (2002). Seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros del valle de Lima. Rev. Inv. Vet., Peru.
7. Quevedo J, Chavez A, Rivera H, Casas E, Serrano E. (2003). Neosporosis en Bovinos lecheros en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. Rev. Investiga. Vet. Peru, Ene. /Jun.
8. Cahuana, C. J. (2006). Seroprevalencia de Neospora caninum en Bovinos lecheros en el sector Sama grande del Distrito de Sama-

- Inclan –Tacna. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnia .Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Católica de Santa María .Arequipa, Perú.
9. Contreras, E. (2009). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos lecheros en el sector del Distrito de Inclan –Sama. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista.
 10. Ticona, J. I. (2010). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos lecheros en el sector del Distrito de Ite –Tacna. Tesis para optar el título de Médico Veterinario y Zootecnista.
 11. Rivera H. (2001). Etiología Infecciosa del Aborto Bovino. Revista de Investigación Veterinaria – Lima, Perú.
 12. Anderson, ML.; B. C. Barr Y P. A. Conrad. (2001). Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*.
 13. Bjerkas, I., S.F. Mohn; Y J. Presthus (2002). Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs.
 14. Basso W, Venturini M, Bacigalupe D, Kienast M, Unzaga J, Larsen A, Machuca M, Venturini I. (2001). Confirmed clinical *Neospora caninum* infection in a Boxer puppy from Argentina. *Vet Parasitol*.
 15. Barr, B.C.; Wouda. (2005). Neosporosis report of the internacional *Neospora* workshop. *Parasitology* Vol.19

16. Wouda, W., T. Dijkstra, A.M. Kramer; C. J. Bartels. (2000). the role of the dog the epidemiology of neosporosis in cattle.
17. Klein F., S. K. Hietala, H. Berthet, P. Very Y D. Gradinaru. (2004). Neospora caninum: enquête sérologique sur les avortements des bovins normands et charolais.
18. Ooi, H. K. Huang, C. C., Yang, C. H., Lee, S. H. (2000). "Serological survey and first finding of Neospora caninum in Taiwan, and the detection of its antibodies in various body fluids of cattle." Vet. Parasitol.
19. Atkinson, R. A.; R. W. Cook, I. A. Reddacliff, J. Rothwell, K. W. Broady, P. A. W. Harper Y J. T. Ellis. (2000). Seroprevalence of Neospora caninum Infection Following an Abortion Outbreak in Dairy Cattle Herd. Aust. Vet. J.
20. Bergeron, N.; G. Fecteau, J. Paré, R. Martineau Y A. Villeneuve. (2000). Vertical and horizontal transmission of Neospora caninum in dairy herds in Québec.
21. Gondim IFP, GAO I, MC Allister MM. (2002). Improved production of Neospora caninum oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts.

22. Campero CM, Anderson ML, Conosciuto G. Odriozola H, (2001). Neospora caninum associated abortion in dairy herd in Argentina. Veterinary Record.
23. 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 de Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Central del Ecuador.
24. Cabera et al, (2000). Evidencia serológica de infección por Neospora caninum en ganado vacuno en Perú .Res IV congreso peruano de parasitología.
25. Andresen, H. (2005). Neosporosis en el Perú y el mundo. Rev. Cienc. Vet. Vol.15
26. Quevedo et al. (2003). Neosporosis en bovinos de lecheros en dos distritos de la provincia de Chachapoyas. Rev. Investiga. Vet. Perú.
27. Atocsa, J. (2005). Seroprevalencia de Neospora caninum en bovinos lecheros criados al pastoreo en la provincia de Melgar, Puno. Tesis para optar el título de Médico Veterinario. Fac. Medicina Veterinaria. UNMSM. Lima - Perú.
28. Linares I. J., (2002). Evidencia serológica de transmisión neonatal de Neospora caninum en ganado vacunos lechero en Cajamarca.

- Tesis de Médico Veterinario. Cajamarca: Facultad de ciencias veterinarias, Univ. Nac. Cajamarca
29. Torres I. (2009). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en ganado vacuno lechero de Chota. Tesis de Médico Veterinario. Cajamarca: Facultad de Ciencias Veterinarias Univ. Nac. De Cajamarca.
 30. Mamani J, (2007). Seroprevalencia *Neospora caninum* en Bovinos Lecheros en el valle de Moquegua, Distrito de Moquegua, Provincia Mariscal Nieto y Departamento de Moquegua-2007. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario y Zootecnista. Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.
 31. Aycachi, R. (2005). Parasitología – *Neospora caninum*, Disponible en:www.Monografías.com/trabajos30/Neosporacanimun/neospora-caninum.shtm.
 32. Mc Allister, M.; C. Bjorkman (2000). Evidence of point- source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows.
 33. Lindsay D.S., Dubey J.P., Mcallister M.M. (2005). *Neospora caninum* and potential for parasite transmission, Compendium.

34. Barriga, O. (2002). Las enfermedades parasitarias de los Animales Domésticos. Primera Edición. Editorial Germinal. Santiago de Chile.
35. Jensen A.M, Björkman C, Kjeldsen AM, Uggla A, (1999). Associations of *Neospora caninum* seropositivity with gestation number and pregnancy outcome in Danish dairy herds.
36. Paré et al., (2002), *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion.
37. Cornejo N.; A. Chavez V.; E. Casa Y C. Arana et al. (2004). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros de la cuenca izquierda del Valle del Manatara. Rev. Investig. Vet. Perú. Vol.15. n° 1.
38. Moore DP, Odeon AC, Venturini MC, Campero CM. (2005). Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación.
39. Dijkstra TH, Barkema HW, Eysker M, Beiboer ML, Wouda W. (2003). Evaluation of a single serological screening of dairy herds for *Neospora caninum* antibodies. Vet Parasitol.
40. Dyer RM, Jenkins MC, Kwok OCH, Douglas IW, Dubey JP. (2000). Serologic survey of *Neospora caninum* infection in a closed dairy cattle herd in Maryland: risk of serologic reactivity by production groups. Vet Parasitol.

41. Dannatt I, Guy F, Trees AJ. (2001). Abortion due to *Neospora* species in a dairy herd. *Vet Rec*
42. Quinn HE, Ellis JT, Smith NC. (2002). *Neospora caninum*: a cause of immune mediated failure of pregnancy.
43. Moskwa B, Pastusiak K, Bien J, Cabaj W. (2007). The first detection of *Neospora caninum* DNA in the colostrum of infected cows.
44. Davison, H.C.; C.S. Guy; J.W. MC Garry; F. Guy; D.J. Williams; D.F. Kelly; A.J. TREES. (2001). Experimental studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res. Vet. Sci.*
45. Rodríguez G. (2009). Neosporosis en la ganadería pecuaria en el Perú. Tesina de Médico Veterinario. Lima: Univ.Nac. Mayor de San Marcos.
46. Fort, M. (2003). *Neospora caninum*: Estudio seroepidemiológico en bovinos de la provincia de La Pampa. Editorial EEA Anguil. La Plata-Argentina.
47. Schares G, Peters M, Wurm R, Barwald A, Conraths F. (2001). The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques.
48. Ugglå, A., S. Stenlund, O. J. M. Holmdahl, E. –B. Jakubek, P. Thebo, H. Kindahl Y C. Björkman. (2000). Oral *Neospora caninum* inoculation of neonatal calves. *Int J Parasitol.*

49. Stenlid et al., (2003), Neospora Species infection in a herd of dairy cattle J. Am. Vet. Med. Assoc.
50. Peters et al., (2000), of vertical transmission of Neospora caninum in dairy cattle by Seis Longical.
51. Cantile C, Arispici M. (2002). Necrotizing cerebellitis due to Neospora caninum infection in an old dog. Journal of Veterinary Medicine.
52. Bildfell et al., (2000). Neosporosis in cattle, Ann Reprod. Sei.
53. De Maerschman et al., (2002), Neospora aborting in New Zealand cattle
54. Cordero Del Campillo.; (2003) F. Rojo Vázquez. (2000). Parasitología Veterinaria. Segunda Edición; Pág. 330-332. McGraw Hill, Inter Americana. Madrid, España.
55. Packham, A. E.; K.W. Sverlow; C. Cray; B.C. Barr. (2000). A Modified Agglutination test for Neospora caninum: development, optimization and comparison to the indirect fluorescent-antibody
56. Ortega- Mora I, Fernández- Garcia A, Gómez- Bautista M. (2006). Diagnosis of bovine neosporosis: Recent advances and perspectives. Acta Parasitología
57. Liddell et al., (2000); Gottstein et al., (2001), A comparative PCR assay For quantitative detection of *Neospora caninum*.

58. Gottstein. B.; S. Eperon; W. J. Dai; A. Cannas; A. Hemphill; G. Greif. (2001). Efficacy of toltrazuril and Ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol. Res.*
59. Jenkins MC, (2001). Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance.
60. Barriga, O. (2002). *Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos primera Edición Germinal*. Santiago de Chile.
61. Instituto Nacional de Estadística (INEI) - 2012 Tacna
62. Puray CH., Chavez V., Casas A, (2006). Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central Del Perú. *Rev. Investig. Vet.* vol.17.

ANEXOS



Fig. A1 Microscopio de Inmunofluorescencia (IFI)

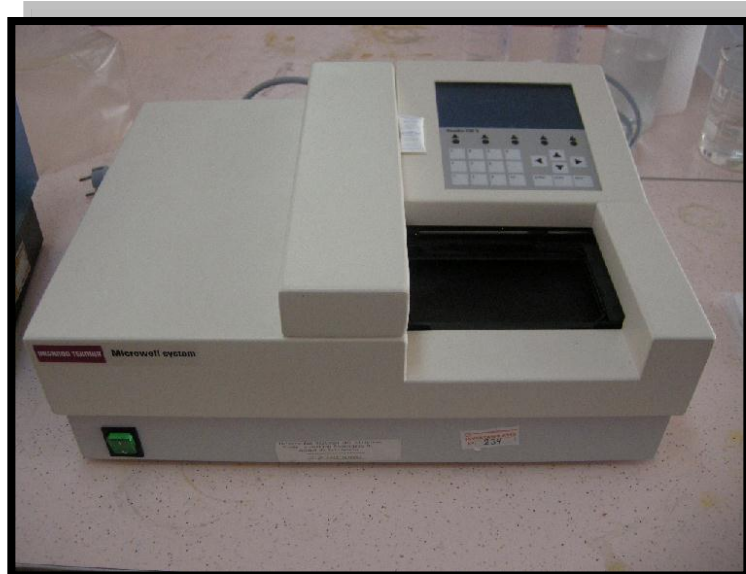


Fig. A2. Lectora espectrofotómetro (Elisa)



Fig A3. MICRO PLACAS – PRUEBA DE ELISA



Fig. A4. REACTIVOS – PRUEBA DE (IFI) y (ELISA)

MATRIZ

N°	DISTRITO	ELISA	IFI	CATEGORIA	ABORTO	TERCIOABORTO	PLACENTA	PERROS	CONOCE	VIA TRANS.	CONTROL
1	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
2	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
3	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
4	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
5	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
6	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
7	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
8	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
9	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
10	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Ignora	Sí	Sí	Vertical	Sí
11	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
12	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	No
13	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Ignora	Sí	Sí	Vertical	Sí
14	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Da al perro	Sí	Sí	Vertical	Sí
15	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Da al perro	Sí	No	Vertical	Sí
16	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	No	Primer tercio	Da al perro	Sí	Sí	Vertical	Sí
17	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	No	Tercer tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	Sí
18	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Ignora	No	No	Horizontal	Sí
19	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	No	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
20	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
21	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	No	Tercer tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	Sí
22	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	No
23	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Da al perro	Sí	Sí	Vertical	No
24	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Da al perro	No	Sí	Vertical	Sí

25	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Primer tercio	Ignora	No	Sí	Vertical	Sí
26	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Ignora	Sí	No	Vertical	Sí
27	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	No	Segundo tercio	Ignora	Sí	Sí	Vertical	Sí
28	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
29	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	Sí
30	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	Sí
31	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
32	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
33	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
34	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Ignora	Sí	No	Vertical	Sí
35	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Da al perro	Sí	No	Vertical	Sí
36	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Da al perro	Sí	Sí	Horizontal	Sí
37	Sama	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Primer tercio	Da al perro	No	Sí	Horizontal	Sí
38	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	No	Primer tercio	Da al perro	No	Sí	Vertical	No
39	Sama	Positivo	Negativo	Vaca	No	Tercer tercio	Ignora	Sí	Sí	Vertical	No
40	Sama	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	No	No	Vertical	No
41	Sama	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	No
42	Sama	Positivo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	Sí
43	Sama	Positivo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	Sí
44	Sama	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Horizontal	Sí
45	Sama	Negativo	Positivo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Horizontal	Sí
46	Sama	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	No
47	Sama	Positivo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	Sí
48	Sama	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	No	No	Vertical	No
49	Sama	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	No	Sí	Vertical	No

50	Sama	Negativo	Positivo	vaquillona	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
51	Sama	Positivo	Negativo	vaquillona	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
52	Sama	Negativo	Negativo	vaquillona	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
53	Sama	Negativo	Negativo	vaquillona	No	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
54	Sama	Negativo	Positivo	vaquillona	No	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
55	Sama	Negativo	Negativo	vaquillona	Sí	Tercer tercio	Entierra	No	Sí	Vertical	Sí
56	Sama	Positivo	Negativo	vaquillona	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
57	Sama	Negativo	Negativo	vaquillona	No	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	No
58	Ite	Positivo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
59	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
60	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	No
61	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	No
62	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	No
63	Ite	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	Sí
64	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	Sí
65	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	No
66	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Ignora	Sí	Sí	Vertical	No
67	Ite	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Ignora	Sí	Sí	Horizontal	Sí
68	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
69	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Si
70	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	No
71	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Ignora	Sí	No	Horizontal	Sí
72	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Ignora	Sí	No	Horizontal	Sí
73	Ite	Positivo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Ignora	Sí	No	Vertical	Sí
74	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	No	Segundo tercio	Ignora	Sí	No	Vertical	Sí

75	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Ignora	No	No	Vertical	No
76	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	No	No	Vertical	No
77	Ite	Positivo	Negativo	Vaca	No	Segundo tercio	Entierra	No	No	Horizontal	No
78	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Si	No	Horizontal	No
79	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	No
80	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	No	Sí	Horizontal	Sí
81	Ite	Positivo	Positivo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
82	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	No	Si	Vertical	Sí
83	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	No	No	Vertical	Sí
84	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	No	Tercer tercio	Entierra	No	Si	Vertical	No
85	Ite	Positivo	Positivo	Vaca	No	Tercer tercio	Ignora	Sí	Sí	Horizontal	No
86	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Ignora	Sí	Sí	Horizontal	Sí
87	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Ignora	Sí	No	Horizontal	Sí
88	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	No
89	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	No
90	Ite	Positivo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	No
91	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Da al perro	Sí	No	Vertical	No
92	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Da al perro	Sí	No	Vertical	No
93	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Da al perro	Sí	No	Vertical	No
94	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	No
95	Ite	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	No	No	Horizontal	No
96	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Da al perro	Sí	No	Vertical	No
97	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Da al perro	No	Si	Vertical	No
98	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
99	Ite	Positivo	Positivo	Vaca	No	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí

100	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	No	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Si
101	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	No	Tercer tercio	Ignora	Sí	No	Vertical	Si
102	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	No	Tercer tercio	Ignora	Si	Si	Horizontal	Si
103	Ite	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Ignora	No	No	Horizontal	Si
104	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Ignora	No	No	Vertical	Si
105	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	No
106	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Ignora	Sí	Sí	Horizontal	No
107	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Da al perro	Sí	Sí	Horizontal	No
108	Ite	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Da al perro	Sí	Sí	Horizontal	Si
109	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	No	Segundo tercio	Da al perro	Sí	No	Vertical	No
110	Ite	Negativo	Positivo	Vaca	No	Segundo tercio	Da al perro	Sí	No	Vertical	Si
111	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	No	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	No
112	Ite	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	No
113	Ite	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	Si
114	Ite	Negativo	Positivo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	Si
115	Ite	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	No
116	Ite	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	No
117	Ite	Positivo	Positivo	Vaquilla	0	0	9	Sí	No	Vertical	No
118	Ite	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	No	Horizontal	Si
119	Ite	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	No	Horizontal	No
120	Ite	Negativo	Positivo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Horizontal	No
121	Ite	Positivo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Horizontal	No
122	Ite	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	No	Vertical	Si
123	Ite	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	No	Sí	Vertical	Si
124	Ite	Negativo	Positivo	vaquillona	Sí	Segundo tercio	Entierra	No	No	Horizontal	Si

125	Ite	Positivo	Negativo	vaquillona	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
126	Ite	Negativo	Negativo	vaquillona	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
127	Ite	Positivo	Positivo	vaquillona	Sí	Tercer tercio	Ignora	Sí	No	Horizontal	No
128	Ite	Negativo	Negativo	vaquillona	Sí	Tercer tercio	Ignora	Sí	No	Vertical	Sí
129	Ite	Positivo	Negativo	vaquillona	No	Tercer tercio	Ignora	Sí	Sí	Horizontal	No
130	Ite	Negativo	Negativo	vaquillona	No	Tercer tercio	Da al perro	Sí	Sí	Vertical	No
131	Ite	Negativo	Positivo	vaquillona	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
132	Ite	Negativo	Negativo	vaquillona	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	Sí
133	Ite	Positivo	Negativo	vaquillona	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	Si
134	Ite	Negativo	Positivo	vaquillona	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	No
135	Locumba	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	Sí
136	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	Sí
137	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
138	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
139	Locumba	Positivo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
140	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Ignora	Sí	Sí	Horizontal	Sí
141	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Ignora	Sí	Sí	Vertical	No
142	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Da al perro	Sí	Sí	Vertical	Sí
143	Locumba	Positivo	Positivo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
144	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
145	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
146	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Ignora	Sí	Sí	Vertical	Sí
147	Locumba	Positivo	Positivo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	No	Sí	Vertical	Sí
148	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	No	Vertical	Sí
149	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Da al perro	Sí	No	Vertical	Sí

150	Locumba	Negativo	Positivo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	No
151	Locumba	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Si
152	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	No	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Si
153	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Da al perro	No	No	Vertical	Si
154	Locumba	Negativo	Positivo	Vaca	No	Tercer tercio	Da al perro	No	Sí	Horizontal	Si
155	Locumba	Positivo	Negativo	Vaca	No	Tercer tercio	Da al perro	Sí	Sí	Horizontal	No
156	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Da al perro	Sí	Sí	Vertical	Si
157	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Entierra	No	Sí	Vertical	Si
158	Locumba	Negativo	Positivo	Vaca	No	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Si
159	Locumba	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	No	Horizontal	Si
160	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	No	Primer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
161	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Da al perro	No	Sí	Vertical	Si
162	Locumba	Negativo	Positivo	Vaca	No	Tercer tercio	Da al perro	Sí	Sí	Vertical	Si
163	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Da al perro	Sí	Sí	Horizontal	Si
164	Locumba	Positivo	Negativo	Vaca	Sí	Tercer tercio	Ignora	Sí	Sí	Horizontal	Si
165	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	Sí	Segundo tercio	Entierra	No	Sí	Vertical	Si
166	Locumba	Negativo	Negativo	Vaca	No	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Si
167	Locumba	Negativo	Positivo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	No
168	Locumba	Positivo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	Si
169	Locumba	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	No	Horizontal	Si
170	Locumba	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Horizontal	No
171	Locumba	Negativo	Positivo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	Si
172	Locumba	Positivo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	No	No	Vertical	Si
173	Locumba	Negativo	Negativo	Vaquilla	0	0	9	Sí	Sí	Vertical	Si
174	Locumba	Negativo	Negativo	vaquillona	No	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Si

175	Locumba	Negativo	Positivo	vaquillona	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
176	Locumba	Negativo	Negativo	vaquillona	No	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí
177	Locumba	Positivo	Negativo	vaquillona	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	No
178	Locumba	Negativo	Negativo	vaquillona	Sí	Tercer tercio	Entierra	Sí	Sí	Vertical	Sí
179	Locumba	Negativo	Positivo	vaquillona	Sí	Segundo tercio	Entierra	Sí	Sí	Horizontal	Sí

