

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**MAESTRÍA EN MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**



**“RELACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS A  
*Neospora caninum* EN LA LIEBRE EUROPEA (*Lepus  
europaeus*) CON LOS ENCONTRADOS EN VACUNOS  
(*Bos taurus*) DEL DISTRITO DE ITE, TACNA 2016”**

Tesis presentada por el Bachiller  
**MARCOS LEANDRO NEIRA HUAMANI**

Para optar el Grado Académico de:  
**MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**AREQUIPA – PERÚ**  
**2016.**



*Agradezco a mis padres por darme el ser, sus enseñanzas, e inculcarme responsabilidad perseverancia, en el logro de mis objetivos*

*A mi amada esposa Katya por ser la persona quien me impulso a desarrollar este estudio de investigación, mis hijos Andrea y Daniel por su comprensión y constante aliento.*

*M. L. N. H.*

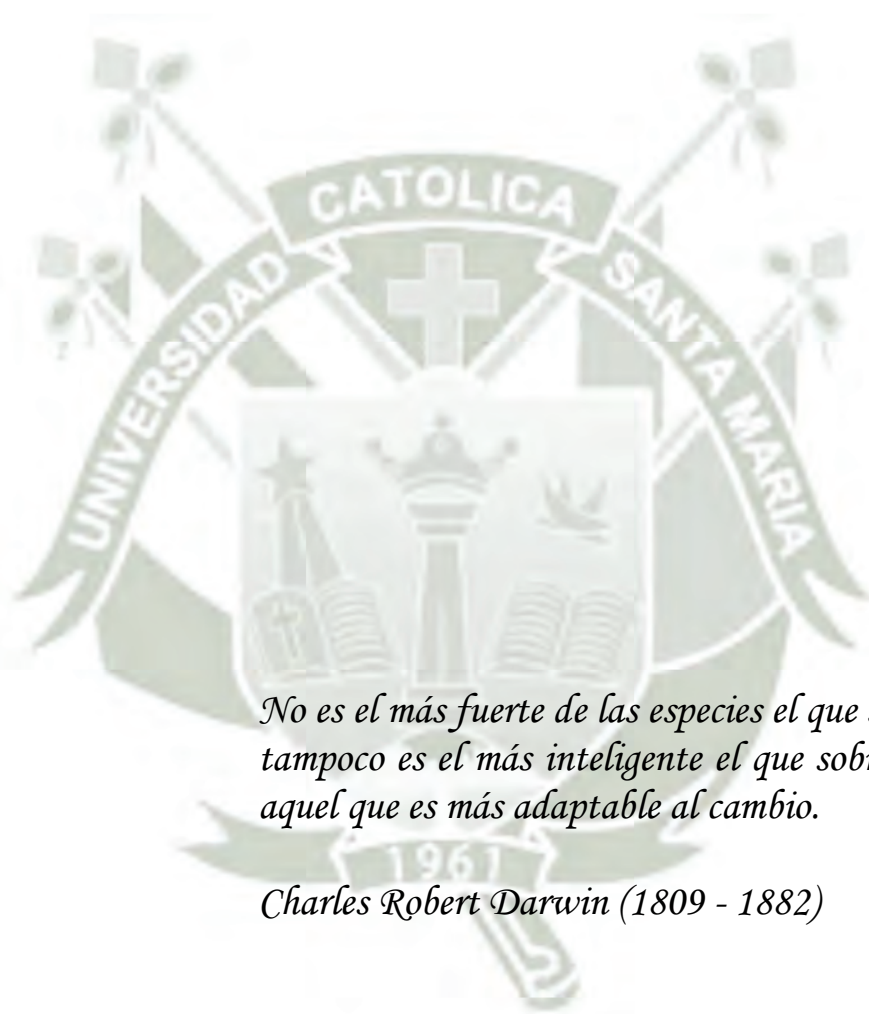


*Gracias a Dios, por guiarme en el camino de la investigación de lo desconocido.*

*A todos aquellos amigos que desinteresadamente, me apoyaron desde el inicio de mi investigación, en Locumba, Ite, Tacna, Arequipa.*

*Aquellas personas que con su conocimiento y orientación me guiaron, con el propósito que este estudio sirva de punto de partida de futuras investigaciones en la fauna silvestre.*

*M. L. N. H.*



*No es el más fuerte de las especies el que sobrevive,  
tampoco es el más inteligente el que sobrevive. Es  
aquel que es más adaptable al cambio.*

*Charles Robert Darwin (1809 - 1882)*

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	8
ABSTRACT .....	9
CAPÍTULO ÚNICO: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	12
CONCLUSIONES.....	24
RECOMENDACIONES .....	25
PROPUESTA .....	26
BIBLIOGRAFÍA .....	31
ANEXOS.....	36
ANEXO N° 1: PROYECTO DE TESIS.....	37
ANEXO N° 2: UBICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO .....	99
ANEXO N° 3: RESULTADOS DE LABORATORIO.....	105
ANEXO N° 4: AUTORIZACIÓN DE CAZA DE LIEBRES EUROPEAS – SERFOR.....	111
ANEXO N° 5: SECUENCIA FOTOGRÁFICA .....	114
ANEXO N° 6: CARTA DE PRESENTACIÓN.....	125

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1:	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA- C. (DO>30), (DO<30) .....	16
TABLA N° 2:	CORRELACIÓN BIVARIADA DE PEARSON.....	17
TABLA N° 3:	COORDENADAS UTM, UBICACIÓN DE LUGARES DE LA TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE LIEBRES Y VACUNOS. ITE.....	101
TABLA N° 4:	RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA c, VMD®, INC.	110



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1:	DENSIDAD ÓPTICA DE LA PRUEBA DE ELISA c A <i>Neospora. caninum</i> EN LIEBRES EUROPEAS .....	13
GRÁFICO N° 2:	DENSIDAD ÓPTICA DE LAPRUEBA DE ELISA c. A <i>Neospora caninum</i> EN VACUNOS.....	14
GRÁFICO N° 3:	COMPARATIVO DE LA DENSIDAD ÓPTICA DE ELISA c. A <i>Neospora caninum</i> EN LIEBRES EUROPEAS Y VACUNOS	15
GRÁFICO N° 4:	CORRELACIÓN DE LA DISPERSIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS EN LIEBRES EUROPEAS Y VACUNOS ...	18
GRÁFICO N° 5:	LUGARES DE MUESTREO QUE TIENEN PRESENCIA DE CANES.....	102
GRÁFICO N° 6:	PROCEDENCIA DONDE FUERON CAZADAS LAS LIEBRES EUROPEAS DE ITE. ....	103
GRÁFICO N° 7:	TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN DE <i>Neospora caninum</i> EN LAGOMORFOS .....	104
GRÁFICO N° 8:	TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN DE <i>Neospora caninum</i> EN VACUNOS DE TACNA .....	105

## RESUMEN

En la última década la liebre europea invasora ha incrementado su presencia en el sur del Perú, ocupando hábitats de diversas especies domésticas, ante el riesgo de comportarse como portadora de enfermedades parasitarias que impacten en la producción del ganado vacuno, provocando cuantiosas pérdidas económicas, nos propusimos realizar el siguiente trabajo de investigación, con el objetivo de evaluar el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas y su relación con el nivel de anticuerpos a *Neospora. caninum* en vacunos.

La investigación se realizó en el distrito de Ite (17° 50' 27", Latitud Sur, 70° 57' 47" de Longitud Oeste) ubicado en la Provincia de Jorge Basadre departamento de Tacna, Perú, durante los meses de agosto a septiembre del presente año, para la identificación del nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas y vacunos, se empleó la prueba serológica de ELISA c, cuya denominación comercial es *Neospora caninum*, Antibody Test Kit ELISA c (VMRD®, Inc.), que utiliza un nivel de corte del 30%; se evaluaron 24 muestras de suero sanguíneo, 12 de liebres europeas y 12 sueros de vacunos. Realizadas las pruebas de laboratorio, se obtuvieron densidades ópticas de 0.904 y 1.085 y 0.21 a 1.483 en sus valores máximos y mínimos respectivamente, aplicando el cálculo del porcentaje de inhibición a los valores del control negativo de densidad óptica de las muestras, se obtuvo niveles de anticuerpos a *Nesopora caninum* de 0% de positivos (0/12) en liebres europeas y 33.3% de positivos (4/12) en vacunos. Realizada la correlación de las dos variables por la prueba estadística de Pearson, se obtuvo un coeficiente de correlación ( $r= 0.235$ ), el cual indica que no existe relación entre los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* de ambas especies. Rechazándose de esta manera la hipótesis planteada en la presente investigación.

Concluyendo que los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* de las liebres europeas no tienen relación con los niveles de anticuerpos encontrados en vacunos del distrito de Ite; probablemente debido que en el habitat donde vive la liebre europea de Ite exista una baja contaminación de ooquistes esporulados de *Neospora caninum* que son eliminados por los huéspedes definitivos perros y zorros. Recomendándose seguir realizando estudios de monitoreo a *Neospora caninum* con un mayor tamaño muestral, considerando los factores de infección, utilizando pruebas serológicas con especificidad y sensibilidad en el análisis de anticuerpos a *Neospora caninum* para liebres europeas.

## ABSTRACT

In the last decade the European invading hare they have increased his presence in south territory of Peru, occupying habitats of diverse domestic species, before the risk of behaving as bearer of parasitic illnesses, that impacten in the production of the dairy cattle causing large economic losses, we proposed to realize the following investigation with the target evaluate the level of antibodies to *Neospora caninum* in European hares and their relation with the level of antibodies to *Neospora caninum* in cattle.

The study was carried out in the district of Ite (17° 50 '27 " , Latitude South, 70° 57' 47" of Longitude West) of the Province of Jorge Basadre - department of Tacna, Peru. The investigation was carried out during the months of August to September of this year, for the identification of the level of antibodies to *Neospora caninum* in European hares and cattle, the serological test of ELISA was used, whose commercial denomination is *Neospora caninum*, Antibody Test Kit ELISA c (VMRD®, Inc.), using a 30% cut-off level, 24 blood serum samples were evaluated; 12 of European hares and 12 sera of cattle, being performed the laboratory tests, optical densities of 0.904 and 1.085 and 0.21 to 1.483 were obtained in their maximum and minimum values respectively, applying the calculation of the percentage of inhibition to the values of the negative control of optical density of the samples, obtained levels of antibodies to *Neospora caninum* were of 0 % Positive (0/12) in European hares and 33.3% positive (4/12) in cattle. Performed the correlation of the two variables by the statistical test of Pearson, a correlation coefficient ( $R = 0.235$ ) which indicates that there is no relationship between the levels of antibodies to *Neospora caninum* of both species. Thus rejecting the hypothesis raised in the present investigation.

Concluding that the levels of antibodies to *Neospora caninum* of the European hares are not related to the levels of antibodies found in cattle from the district of Ite; Probably because in the habitat where the European hare of Ite lives there is a low contamination of sporadic oocysts of *Neospora caninum* that are eliminated by the definitive hosts dogs and foxes. It is recommended to continue carrying out monitoring studies on *Neospora caninum* with a larger sample size, considering the factors of infection, using serological tests with specificity and sensitivity in the analysis of antibodies to *Neospora caninum* for European har.

## INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos claros e importantes del médico veterinario, es disminuir los riesgos de presentación y/o contagio de enfermedades.

Se conoce desde hace muchos años que las enfermedades juegan un papel muy importante en la dinámica de las poblaciones, es entonces que la medicina veterinaria empieza a jugar un papel importante debido a que se aproxima al conocimiento de las poblaciones y los ecosistemas para la prevención, manejo y tratamiento de enfermedades.

Uno de los obstáculos principales con los que se encuentran los médicos veterinarios para intervenir en la fauna silvestre, es la falta de información epidemiológica; siendo un reto el conocer los agentes infecciosos que comparten las especies silvestres y que representan amenazas enormes para poblaciones domésticas.

La liebre europea, es considerada una especie silvestre invasora en el Perú, su alto potencial reproductivo y la gran capacidad de adaptación favorecen su extraordinaria difusión, en la actualidad, se encuentra ocupando gran parte del territorio sur peruano, la preocupación por las enfermedades emergentes está aumentando en los últimos años, por su relación de interfaz entre el ganado y la fauna silvestre.

Las enfermedades relacionadas con las liebres europeas, requieren una especial atención, por sus posibles implicancias en la fauna nativa y en especial de la ganadería lechera.

Diferentes investigaciones en el mundo indican que la liebre europea es un portador de *Neospora caninum*, enfermedad parasitaria grave del ganado bovino lechero. Siendo causante de abortos y mortalidad neonatal, hechos que causan grandes pérdidas económicas en la explotación ganadera. Por ello nos propusimos evaluar a través de este

estudio la relación de los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas y vacunos del distrito de Ite, buscando definir si existe una relación de la enfermedad entre ambas especies


A través de esta investigación buscamos, alcanzar información científica de los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* encontrados en las liebres europeas del distrito de Ite; la información obtenida permitirá intervenir con un nivel de prevención en caso que se requiera realizar medidas de prevención y control de Neosporosis en especies susceptibles, así evitar la transmisión de enfermedades entre las liebres europeas y vacunos.

El informe del trabajo de investigación está organizado de la siguiente manera:

La primera parte está compuesta por los aspectos iniciales o formales del informe como: la portada, dedicatoria, epígrafe, índice general, resumen, abstract e introducción.

La segunda parte está compuesta por los aspectos centrales o cuerpo del informe tales como un capítulo único, el cual contiene: los resultados, discusión, la propuesta, conclusiones y recomendaciones.

La tercera parte está compuesta por los aspectos finales y formales que son la bibliografía y los anexos.

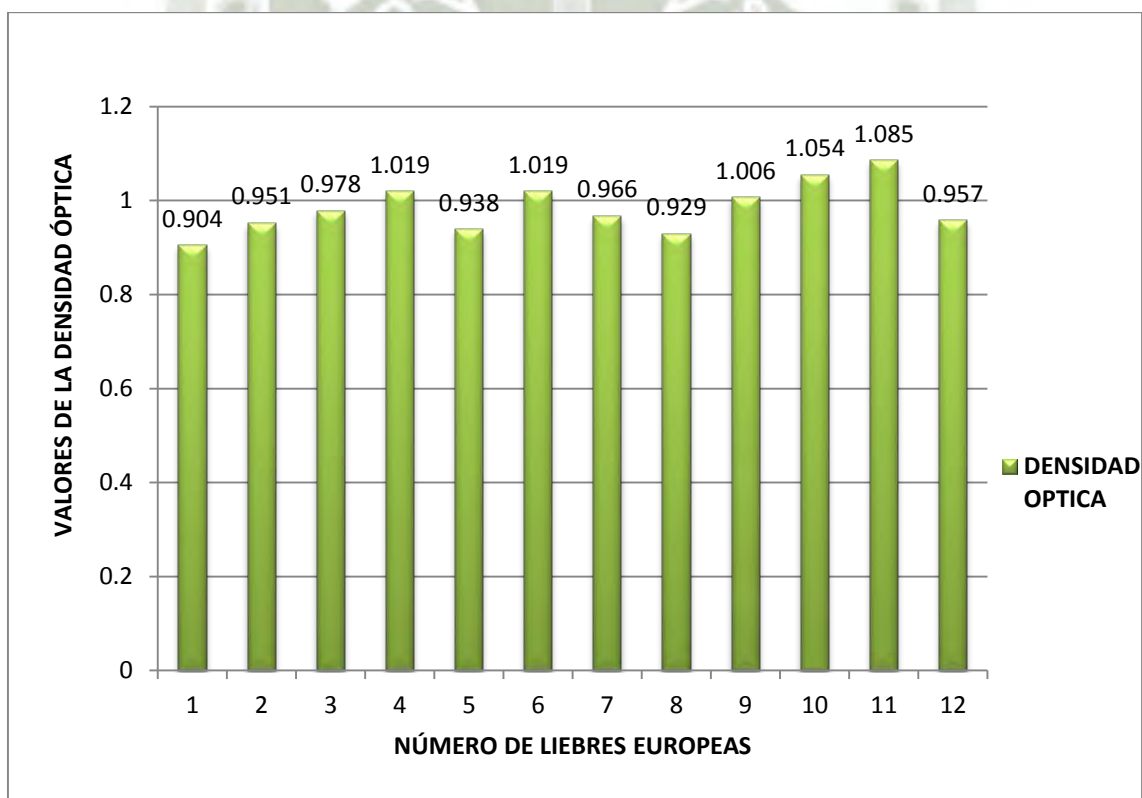


**CAPÍTULO ÚNICO:  
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 1. NIVELES DE ANTICUERPOS EN LIEBRES EUROPEAS

Se analizaron un total de 12 muestras de suero sanguíneo, mediante la prueba de (ELISA c), las que correspondieron a liebres europeas en estado silvestre, procedentes del distrito de Ite. Se muestran los resultados de las densidades ópticas de los anticuerpos a *Neospora caninum*, de cada una de las muestras analizadas en el Gráfico N° 1.

**GRÁFICO N° 1:**  
**DENSIDAD ÓPTICA DE LA PRUEBA DE ELISA c A *Neospora. caninum* EN LIEBRES EUROPEAS**

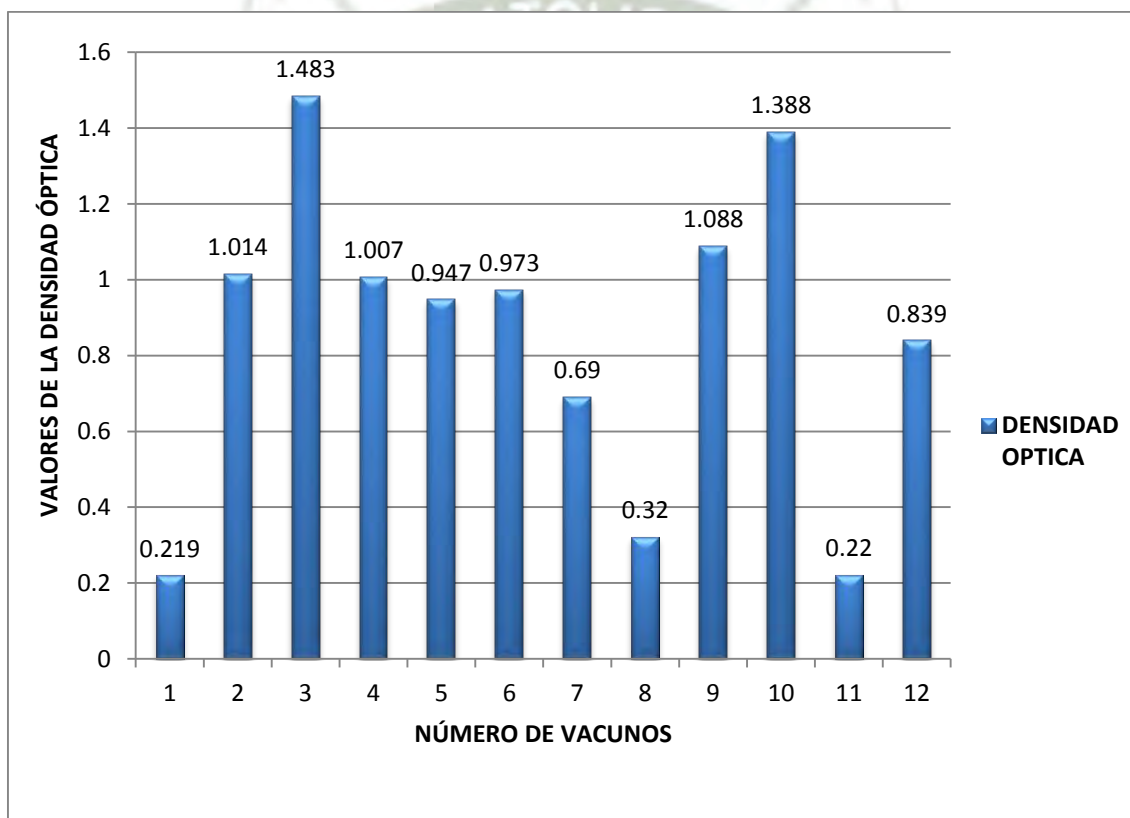


Para determinar el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas se utilizó el kit comercial *Neospora caninum*, Antibody Test Kit ELISA c (VMRD®, Inc.); que utiliza un nivel de corte del 30%.

## 2. NIVELES DE ANTICUERPOS EN VACUNOS

Se analizaron 12 muestras de suero sanguíneo de vacunos mediante la prueba de (ELISA c), procedentes del distrito de Ite. Se muestran los resultados de las densidades ópticas de los anticuerpos a *Neospora caninum* de cada una de las muestras analizadas en el Grafico N° 2

**GRÁFICO N° 2:**  
**DENSIDAD ÓPTICA DE LA PRUEBA DE ELISA c. A *Neospora caninum* EN VACUNOS**

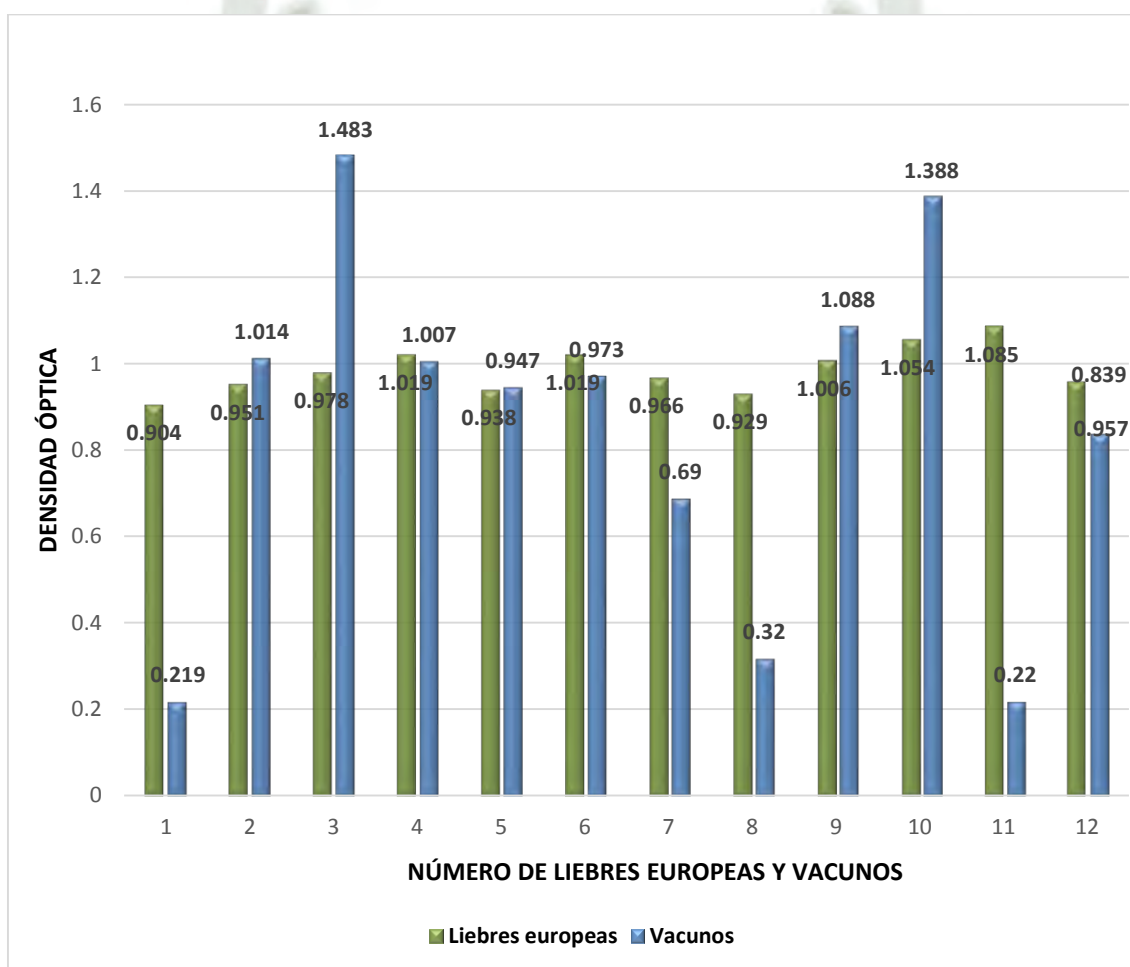


Para determinar el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en vacunos se utilizó el kit comercial *Neospora caninum*, Antibody Test Kit ELISA c (VMRD®, Inc.); que utiliza un nivel de corte del 30%.

### 3. COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS.

El gráfico N° 3 muestra, un histograma comparativo de las densidades ópticas de los anticuerpos a *Neospora caninum* encontradas en liebres europeas y vacunos.

**GRÁFICO N° 3:**  
**COMPARATIVO DE LA DENSIDAD ÓPTICA DE ELISA c. A *Neospora caninum* EN LIEBRES EUROPEAS Y VACUNOS**



Los valores de las densidades ópticas de los anticuerpos (máximos y mínimos) estuvieron en los rangos de (1,085 a 0,904) en liebres europeas y (1,483 a 0,219) en vacunos.

#### 4. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA c

Se analizaron 24 sueros mediante la prueba ELISA-c para la identificación de *Neospora caninum*, encontrando 0% de positivos en (0/12) muestras de suero sanguíneo de liebres europeas, y 33.3% de positivos en (4/12), muestras de suero sanguíneo en vacunos.

**TABLA N° 1:**  
**RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA- C. ( $DO \geq 30$ ), ( $DO < 30$ )**

Prueba	Especies	Total muestras	N° de muestras (+)	Seropositivos ( $DO \geq 30$ ) (%)	N° de muestras (-)	Seronegativos ( $DO < 30$ ) (%)
ELISA c (VMRD®)	Liebres europeas	12	0,00	0,00	12,00	100
	Vacunos	12	4,00	0,33	8,00	0,67

Aplicando el cálculo del porcentaje de inhibición, a los valores del control negativo (CN) de las densidades ópticas (DO) de las muestras, de acuerdo a la fórmula del kit ELISA VMRD. Los rangos de inhibición que obtuvimos fluctuaron entre 19.78% a 6.47% en liebres europeas y de 80.56% a -31.58% en vacunos, considerándose, una muestra positiva a *Neospora caninum*, cuando el valor de la DO del CN  $\geq 0.30$  % y negativo, si la DO del CN  $< 0.30$ %. (Ver Anexo N° 3, Tabla N° 4)

## 5. CORRELACIÓN BIVARIADA DE PEARSON.

La correlación bivariada de Pearson, permite analizar la relación entre la variable independiente (niveles de anticuerpos *Neospora caninum* en liebres europeas) y la variable dependiente (relación de niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* entre liebres europeas y vacunos) que se aprecian en el tabla N°2

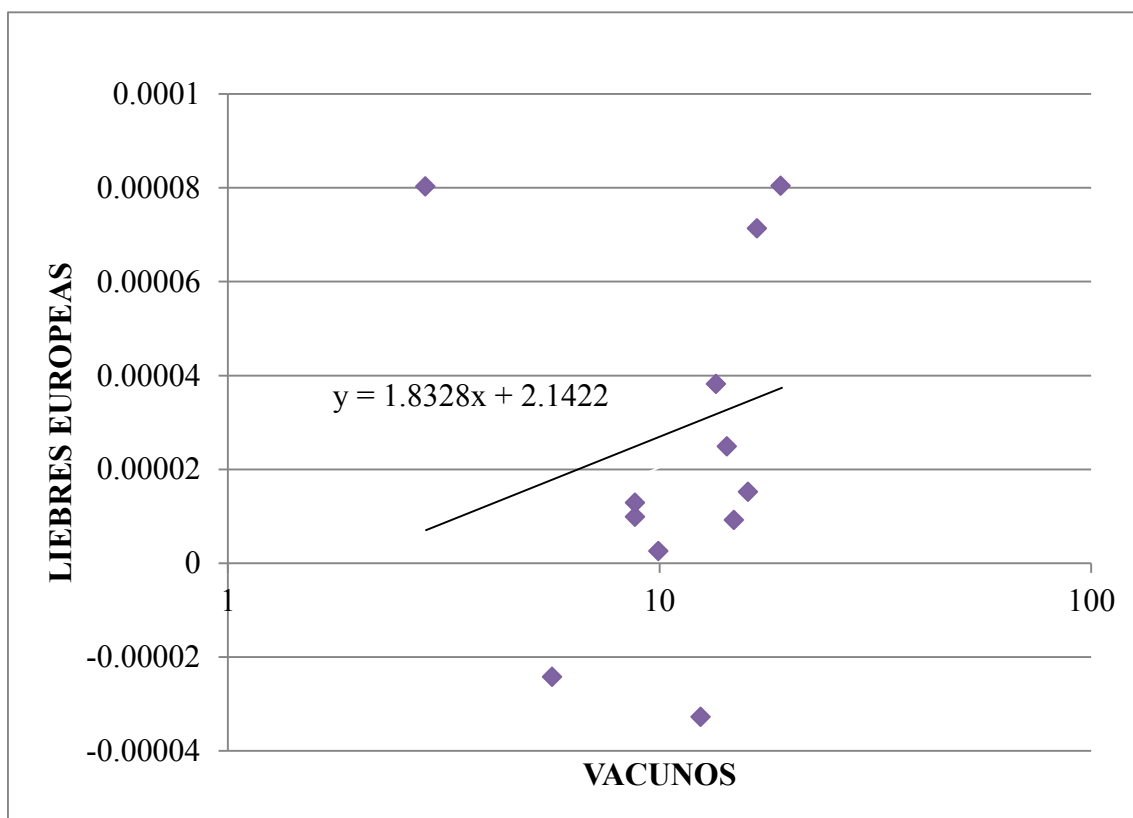
**TABLA N° 2:**  
**CORRELACIÓN BIVARIADA DE PEARSON.**

Variables	Descripción	Liebres europeas	Vacunos
Niveles de anticuerpos a <i>Neospora caninum</i> en la liebre europea	Correlación de Pearson	1	0.235
	Significancia bilateral		0.461
	Número de muestras	12	12
Relación entre los niveles de anticuerpos a <i>Neospora caninum</i> en liebres europeas y vacunos	Correlación de Pearson	0.235	1
	Significancia bilateral	0.465	
	Número de muestras	12	12

Realizado el análisis estadístico de la correlación de Pearson, se obtuvo un coeficiente (r) 0.235, demostrando que no existe una relación, entre los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* entre las liebres europeas y vacunos del distrito de Ite.

En el gráfico N° 4 se presenta en el eje “y” los niveles de anticuerpos en liebres europeas, y en el eje “x” los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* de vacunos.

**GRÁFICO N° 4:**  
**CORRELACIÓN DE LA DISPERSIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS**  
**EN LIEBRES EUROPEAS Y VACUNOS**



La línea de regresión “Y” grafica una tendencia positiva entre variables, a medida que los niveles de anticuerpos en liebres europeas se incrementan, los niveles de anticuerpos en vacunos también se incrementan y viceversa.

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para identificar el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas y vacunos del distrito de Ite, se utilizó la prueba serológica de ELISA c, cuya denominación comercial es *N. caninum*, Antibody Test Kit ELISA c (VMRD®, Inc.), realizadas las pruebas de laboratorio, se obtuvo niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* de 0% de negativas en (0/12) liebres europeas y 33.3% de positivas (4/12) en vacunos, los valores de la densidad óptica máximos y mínimos fueron (0.904 y 1.085) y (0.21 a 1.483) respectivamente, la medida de corte de la prueba fue de (30%). Determinándose que no existe una relación de los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas y vacunos del distrito de Ite, evidenciando la no existencia de una parasitosis cruzada para *Neospora caninum* entre liebres europeas y vacunos, rechazándose de esta forma la hipótesis planteada en el presente estudio de investigación.

Nuestros resultados fueron similares a los que obtuvo Almería *et al.*, (2006)., en una muestra de 251 conejos silvestres de monte (*Oryctolagus cuniculus*) procedentes de España usando la prueba de ELISA c y muy parecidos a los de Garashi *et al.*, (2014)., quien trabajó con una muestra de 337 conejos (*Oryctolagus cuniculus*) encontrando niveles de anticuerpos de 0.29% (1/337) de IgG y IgM ELISA. Los resultados de este estudio indican baja seroprevalencia de *Neospora caninum* atribuyendo ello a una escasa contaminación de ooquistes en el entorno; de manera que nos haría suponer que los niveles de la enfermedad estarían asociados a factores de infección. Rodríguez (2015), describe los factores que incrementan el riesgo de infección a *Neospora caninum* como: la edad, tamaño poblacional, presencia de hospederos definitivos e intermediarios, reposición de reproductores, clima, hábitos alimenticios y raza.

Baldone *et al.*, (2004), usando el kit, ELISA c (VMRD®; Inc.), el mismo que utilizamos en nuestro estudio, obtuvo niveles anticuerpos (10.8%) 5/46; indicando que las liebres europeas están expuestas a *Neospora caninum*, por ser presas comunes de canidos podrían ser una fuente de infección, para perros y zorros; sus resultados se contraponen a los nuestros, lo que haría suponer que ellos estarían siendo influenciados

por factores que incrementan el riesgo de infección probablemente a la presencia de perros, zorros y población de liebres.

En consecuencia Dubey (2011) indica que la ingestión de ooquistes es el único modo demostrado para la transmisión horizontal de *Neospora caninum* en herbívoros; confirmándose como huéspedes definitivos a los perros domésticos y salvajes, (*Canis familiaris*), McAllister (1998), coyotes (*C. latrans*), Gondim (2004), los dingos (*C. lupus dingo*), King et al (2010), lobos grises (*C. lupus*). Dubey (2011), como especies que son capaces de excretar ooquistes resistentes al medio ambiente, los ooquistes esporulan fuera del huésped en tan sólo 24 horas, afirmando que no se conoce mucho acerca de la supervivencia de ooquistes de *Neospora caninum* en el medio ambiente. Así mismo Robbe (2016), en Italia demostró que los perros que viven en las granjas de ganado mostraron una mayor seropositividad para *Neospora caninum* (46%), en comparación con los que viven en la cría de perros (18%); la elevada presencia de perros seropositivos en las explotaciones ganaderas demuestra el riesgo potencial de transmisión horizontal de *Neospora caninum* entre los perros y el ganado. En este estudio encontramos en 5/6 puntos de muestreo la presencia de perros domésticos (Ver Anexo N° 2, Gráfico N° 5) lo que coincide con Flores (2015), quien reportó la presencia de perros en todos los establos de Ite; en consecuencia por su estrecha relación con el manejo de los vacunos, es posible que varios de ellos frecuenten las parcelas de pastoreo y de haber consumido tejidos de huéspedes contaminados, y que pueden contaminar con ooquistes de *Neospora caninum* las parcelas de pastoreo; no se tiene información sobre la población de zorros silvestres en la zona, los pobladores reportan que ocasionalmente los observado por las noches. De otro lado se ha observado hábitos de convivencia y alimentación superpuestos entre liebres europeas invasoras y vacunos en las zonas de pastoreo del Distrito de Ite, existiendo cierto grado de solapamiento por el consumo de alimentos, en ese sentido Bonino (2006) en Argentina demostró que existe un solapamiento dietario en el conejo – bovino, del 60%. En nuestro estudio 11/12 liebres europeas fueron cazadas cuando consumían forraje (Ver Anexo N° 2, Gráfico N° 6), en áreas donde regularmente pastorean los vacunos; situación que concuerda con lo señalado por Bonino. Siendo las dos especies del presente estudio herbívoras, existe la posibilidad que puedan consumir ooquistes esporulado de un mismo punto de infección.

La Arena (2013), informó que acopiadores y cazadores cercanos a General Pico, La Pampa, por día ingresan a faenar entre 5.000 y 7.000 liebres, el diario Clarín (2015), indicó que durante ese año se exportaron 2.068 TM de carne de liebres, hace diez años atrás fueron 4.585 TM de carne. Sin embargo, reportes de Grigera y Rapoport (1983), indicaron que hasta ese año no se registró la presencia de liebres europeas en el Perú; por su parte Cossíos (2004); reporta que el primer registro de liebres europeas, ocurrió el año 2002, para el departamento de Tacna. Dado que Barling *et al.*, (2001) demostraron que la seropositividad aumenta a medida que se incrementa la densidad animal; asimismo Otranto *et al.*, (2003) señaló que esto podría deberse a un incremento en la probabilidad de la transmisión horizontal; a partir de una fuente puntual de exposición a ooquistes infectantes. Así también Dubey *et al.*, (2007), indicó que existe una asociación positiva entre la abundancia de cánidos silvestres y la seropositividad de los bovinos. Sin embargo, los factores como presencia de perros domésticos y zorros, hábitos de alimentación, descritos anteriormente habrían influenciado en estos resultados; asimismo, debemos de considerar que la presencia de liebres europeas en el Perú es reciente, lo que podría influenciar en la presencia de neosporosis en las liebres europeas del Distrito de Ite.

Diferentes estudios en Lagomorfos, utilizando diversas técnicas serológicas, encontraron los siguientes resultados: Machacová, Bártová, *et al.*, (2015), en muestras de sangre de conejos reproductores procedentes 13 granjas comerciales en el norte de Italia, encontraron 3/260 (1.2%), de anticuerpos de *Neospora caninum*, usando la prueba de anticuerpos de fluorescencia indirecta (IFAT). Asimismo Zanet *et al.*, (2013), en conejos de rabo blanco del este de *Sylvilagus floridanus* encontró, 3/144 (2.08%), muestras positivas a *Neospora caninum*, mediante la prueba PCR. Ebani *et al.*, (2013), en *Lepus europaeus*, de la Provincia de Pisa (centro del Italia), encontró *Neospora caninum*, en 3/222 (1.3%). De otro lado, Bártová *et al.*, (2010), encontró que reaccionaron positivamente para *Neospora caninum* 280/925 (30%), liebres en la República Checa y Austria. También Hugles *et al.*, (2008), mediante PCR, determinó la presencia de *Neospora caninum*, en (6/57) 10.5%. Conejos de monte (*Oryctolagus cuniculus*) zona Malham de los valles de Yorkshire De otro lado, Ferroglio *et al.*, (2003), indica una seroprevalencia de 7/137 (8%) de *Neospora caninum*, en sueros de 93 liebres europeas procedentes de Hungría y 44 liebres procedentes de Eslovaquia,

utilizando la prueba de aglutinación directa (DAT). Cabe considerar que los estudios mostrados se fundamentan en diferentes pruebas serológicas, obteniendo niveles de seroprevalencia a *Neospora caninum*, que varían del 1.2% al 30%; evidenciando una alta dispersión en los resultados obtenidos, que se diferencian a los obtenidos en esta investigación. Sin embargo, si consideramos los tamaños de muestra analizados, zonas de procedencia muestral, diseño de los estudios y técnicas serológicas utilizadas, podríamos atribuir la elevada dispersión de resultados, a factores de especificidad, sensibilidad de las pruebas utilizadas y a factores de riesgo de la infección, Shanon *et al.*, (2015)., indica que los datos sobre los niveles de seroprevalencia varían entre países y lugares la mayoría de estos no son comparables, considerando que varios de los estudios se basaron en sólo una técnica serológica no validada para liebres, por lo tanto los resultados obtenidos deben ser tomados en cuenta con moderación, debido que la sensibilidad de *Neospora caninum* en liebres es aún discutida.

Jakubek *et al.*, (2012), señala que la mayoría de los estudios en la fauna silvestre se basan en técnicas de ELISA competitivo (ELISA c), y ensayos de aglutinación (NAT), ya que no necesitan anticuerpos secundarios específicos de especie. Para las técnicas de ELISA c, el principio de la competencia hace que esta prueba teóricamente sea posible de ser utilizada en cualquier especie, pero los datos de validación todavía no están disponibles para muchas de ellas. La mayor parte de las pruebas sólo se han validado para bovinos y perros, el valor de especificidad, sensibilidad y corte de las pruebas serológicas no han sido evaluadas en muchas especies silvestres. Sin embargo, Guido *et al.*, (2015)., señala que debido a la dinámica particular de la interacción huésped-parásito y de las características de las herramientas de diagnóstico utilizadas en la actualidad, una proporción de ganado infectado no puede ser identificado de forma fiable, y potencialmente podría socavar los esfuerzos hacia el control de la neosporosis bovina. Se discuten los métodos actuales de diagnóstico para la infección por *Neospora caninum* en bovinos; en este sentido Yao *et al.*, (2009), indica que la sensibilidad de la prueba de ELISA depende del valor de corte utilizado como criterio de infección en la prueba, animales con bajos niveles de anticuerpos pueden ser negativos en las pruebas de ELISA debido a la baja sensibilidad de la prueba., Jenkins *et al.*, (1997), Stenlund *et al.*, (1999), Sager *et al.*, (2001) demostraron que los niveles de anticuerpos pueden persistir por largos períodos de tiempo y presentar fluctuaciones. Se conocen estudios

en vacunos que han demostrado que los anticuerpos específicos a *Neospora caninum* pueden fluctuar durante el embarazo de las especies analizadas y caer por debajo de los niveles detectables. Dubey y Schares; (2011), señalan que los animales infectados no siempre desarrollan una respuesta de anticuerpos detectable; de Mares *et al.*, (1999), y Linsay *et al.*, (1999), indican que ello puede ser válido en los animales salvajes; tomando en consideración los resultados experimentales en aves. Tomando en cuenta la importancia de estas investigaciones, a la vista de nuestros resultados, creemos que se requiere profundizar los estudios y desarrollar o aplicar pruebas específicas a *Neospora caninum*, con sensibilidad y especificidad en liebres europeas, debido que diversos estudios discuten sobre fiabilidad de las pruebas para detección de anticuerpos a esta especie, más aún si estas no han sido validadas para liebres europeas y otras especies silvestres; en este sentido los datos de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación deberán ser considerados como punto de inicio para futuras investigaciones.

Mac Donald (2001), afirma que mayoría de las liebres son no territoriales, tienen un comportamiento solitario, generalmente son de hábitos nocturnos, algunas liebres ocupan áreas de distribución de hasta 300 hectáreas. Chapman (1990), indica pueden movilizarse hasta 1,8 km en busca del pasto adecuado y recorrer distancias hasta 15 km en una noche mientras se alimentan; Wilson, Ruff (2009), observó que las liebres tienden a residir en cuevas o grietas en las rocas, bosques, bosques abiertos, planicies, zonas cercanas a los desiertos y terrenos de cultivo, estas afirmaciones concuerdan con lo observado en este estudio (Ver Anexo N° 2, Tabla N° 3), durante el día las liebres europeas del distrito de Ite se refugian en áreas desérticas, zonas rocosas que rodean a las zonas de cultivos; por las noches ingresan a los campos de pastoreo, muy temprano por las mañanas vuelven a sus refugios. Estas condiciones de comportamiento harían que se limite el contacto con la fuente de infección, los ooquistes esporulados, que son regados por perros domésticos y zorros en los campos de pastoreo y el agua, lo cual habría influenciado en estos resultados.

## CONCLUSIONES

### PRIMERA:

En el presente trabajo de investigación se evaluó la presencia de *Neospora caninum*, en liebres europeas y vacunos, realizada la correlación de variables mediante la prueba estadística de Pearson se demostró que no existe una relación entre los niveles anticuerpos a *Neospora caninum* de liebres europeas y vacunos del distrito de Ite.

### SEGUNDA:

Los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* encontrados en liebres europeas de Ite son negativos. 0% (0/12) muestras.

### TERCERA:

Se encontraron niveles de anticuerpos a *Neospora caninum*, en (4/12) muestras de suero sanguíneo de vacunos con un 33.33% de casos positivos.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de monitoreo en *Neospora caninum*, con un mayor tamaño muestral, considerando los factores de infección, utilizando pruebas serológicas con especificidad y sensibilidad de anticuerpos, para liebres europeas.
2. Realizar un monitoreo de neosporosis en perros domesticos de Ite, como medida de prevención y riesgo de transmisión en vacunos.
3. Capacitar a los profesionales, técnicos y productores ganaderos sobre los factores que incrementan el riesgo de infección de neosporosis en vacunos.





## I. ASPECTOS GENERALES

### GENERALIDADES

La neosporosis es una enfermedad que afecta el ganado vacuno, ocasionando abortos, y cuantiosas pérdidas económicas a los ganaderos del distrito de Ite, entidades como el SENASA, y la Municipalidad Distrital de Ite vienen desarrollando esfuerzos conjuntos para su erradicación, sin embargo, la liebre europea se ha introducido en la zona de crianza y en la actualidad mantiene un hábitat de convivencia superpuesta con el ganado vacuno, muchos ganaderos desconocen el rol que cumple en la enfermedad, razón por la cual no es tomada en cuenta, en este sentido se busca alcanzar información a los ganaderos sobre las implicancias que pudiera tener esta especie invasora en la explotación ganadera.

### CARACTERÍSTICAS

Una de las más importantes cuencas lecheras del departamento de Tacna, lo constituye el distrito de Ite, que a través de distintos proyectos ganaderos, en los últimos años ha realizado importantes esfuerzos para la mejorar ganadería, en su alimentación, sanidad, manejo, introduciendo ganado mejorado de diferentes regiones del Perú; estando próximamente a importar vacunos lecheros, es muy importante considerar los factores sanitarios, epidemiológicos que podrían influenciar la sostenibilidad, y rentabilidad de la explotación, por ello buscamos concientizar a los propietarios de ganado, profesionales y técnicos sobre los factores epidemiológicos que afectan en la transmisión de la neosporosis y su relación con la liebres europeas y el ganado vacuno.

### PROBLEMÁTICA Y CARACTERÍSTICAS

La Neosporosis es una enfermedad causada por *Neospora caninum*, un protozoario con una amplia gama de hospederos pero con una preferencia por el ganado y los perros. Se ha convertido en una enfermedad de importancia internacional, ya que es una de las principales causas de aborto en el ganado bovino, y por lo tanto una enfermedad de gran importancia económica en la ganadería lechera. Las pérdidas económicas se atribuyen a un alargado intervalo entre partos, menor producción de

leche y una tasa de sacrificio elevado. Actualmente, no existe ningún tratamiento o vacuna eficaz. Sin embargo, la presencia de liebres europeas debe considerarse un factor de riesgo de la enfermedad, pudiendo incrementar su dispersión, es por ello que su presencia debe ser tomada con atención, En la actualidad la presencia de la liebre europea en el distrito de Ite pasa desapercibida, la mayoría de los productores ganaderos desconocen el riesgo que representa su presencia para el ganado lechero, en ese sentido nos propusimos realizar el trabajo de investigación denominado, “Relación de los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* en la liebre europea (*Lepus europaeus*) con los encontrados en vacunos (*Bos taurus*) del distrito de Ite, Tacna 2016” cuyos resultados y conclusiones daremos a conocer mediante esta capacitación a criadores, profesionales, técnicos del distrito de Ite,

## **OBJETIVOS:**

### **Objetivo General.**

Capacitar a los productores ganaderos, profesionales y técnicos de Ite sobre la importancia de la neosporosis en la producción del ganado vacuno.

### **Objetivos específicos**

- Brindar información del estatus sanitario de la liebre europea con relación a los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* encontrados en Ite.
- Capacitar sobre los factores que incrementan el riesgo de infección de la neosporosis.

## **II. FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN**

### **Análisis de Demanda**

Los profesionales, técnicos y productores ganaderos, del distrito de Ite, son quienes buscan mejorar sus conocimientos sobre la neosporosis en liebres europeas y su relación con el ganado lechero.

### **Análisis de Oferta**

La Universidad Católica de Santa María, promueve la realización de eventos, con temas de actualidad que tienen relevancia científica, poniéndolos a disposición de profesionales, técnicos, productores ganaderos y público en general

### **Balance de Oferta y Demanda**

Las explotaciones ganaderas cada vez son más exigentes en sus sistemas de producción, existiendo una gran demanda por nuevos conocimientos e información, por profesionales, técnicos y ganaderos que buscan aminorar, los riesgos productivos y pérdidas económicas, siendo necesario capacitar a los actores sobre la implicancia y los riesgos de la neosporosis en la liebre europea y los vacunos

### **Presupuesto**

El gasto que demande la realización de este evento de capacitación será cubierto al 100% por la Municipalidad Distrital de Ite.

### **III. PONENTE.**

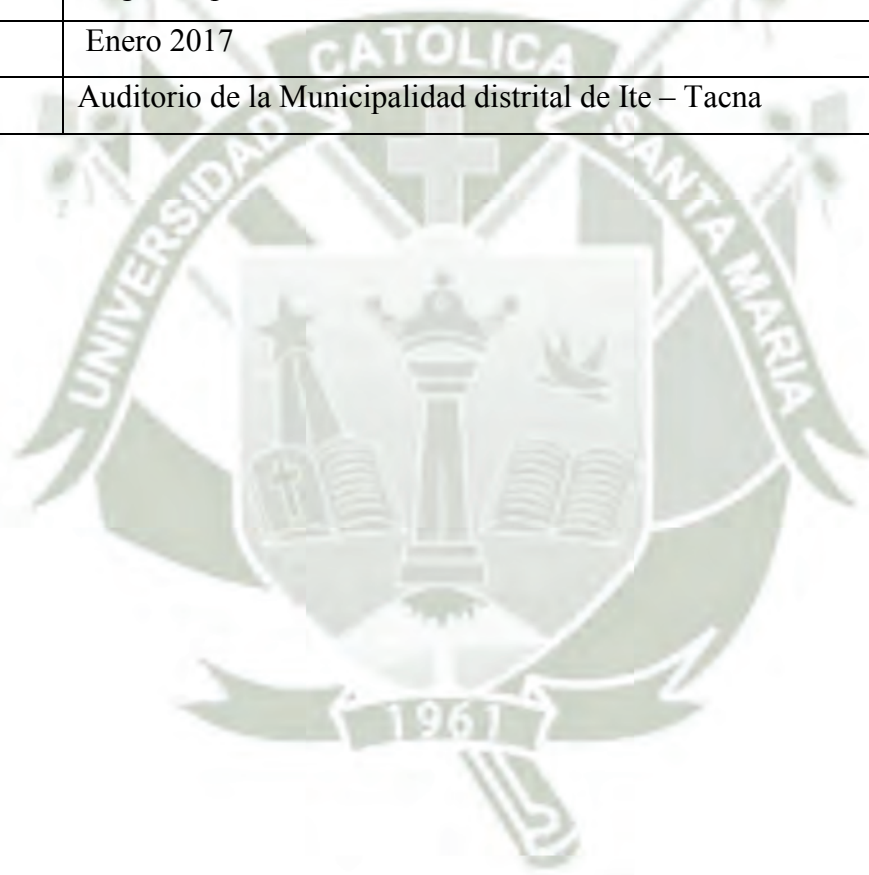
Profesional en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Universidad Católica Santa María.

<b>NOMBRE</b>	<b>FUNCION TÉCNICA</b>
Marcos Leandro Neira Huamani	Investigador principal
Luis Alberto Mamani	Veterinario del centro recria Ite

#### IV. PROGRAMA

LA NEOSPOROSIS EN LIEBRES EUROPEAS Y SU RELACIÓN CON VACUNOS LECHEROS DE ITE.	
9:30 a 9:45	Presentación
9:45 a10:45	Niveles de anticuerpos a <i>Neospora caninum</i> encontrados en liebres europeas de Ite.
10:45 a11:00	Break
11:00 a12:00	Factores que incrementan el riesgo de neosporosis vacunos de Ite.
12:00 a12:30	Preguntas publico
Fecha	Enero 2017
Lugar	Auditorio de la Municipalidad distrital de Ite – Tacna



**BIBLIOGRAFÍA**

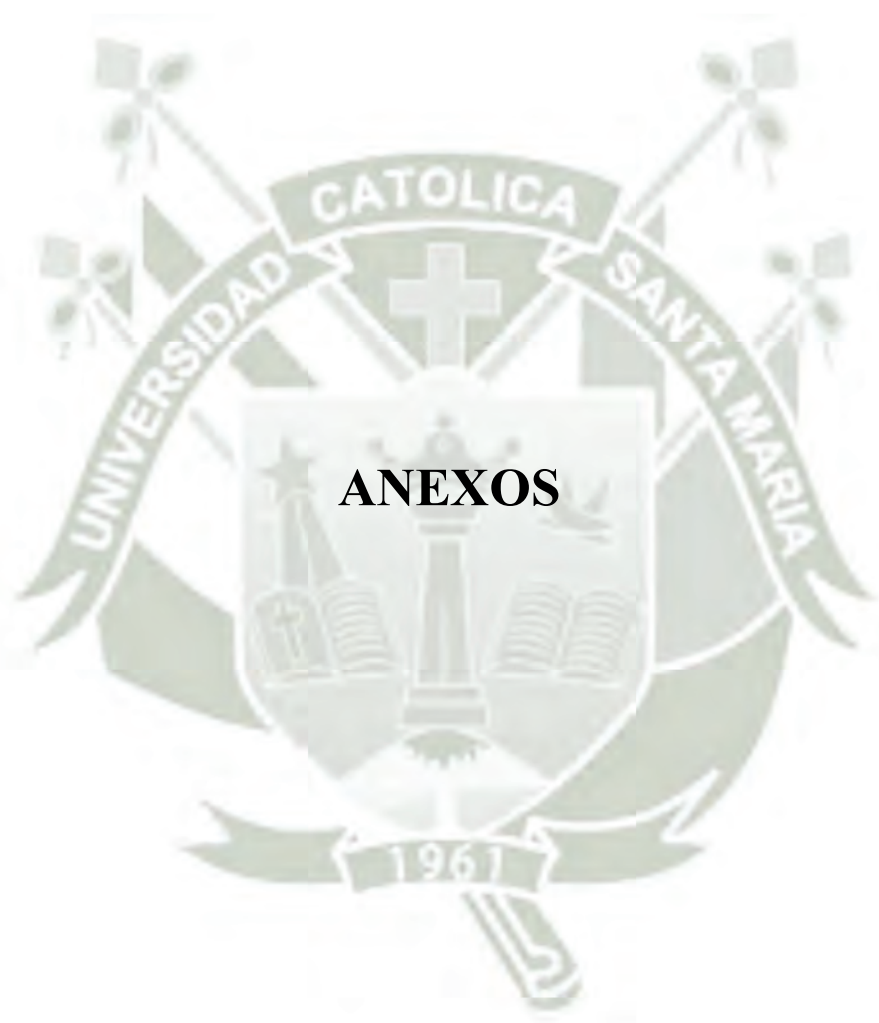
1. Almería S. *Neospora caninum* y Vida Silvestre. ISRN Parasitol. 2013; 947.347. Doi: 10.5402 / 2013/947347. PMCID: PMC4890850.
2. Almería S., Vidal D., Ferrer D., *et al.* La seroprevalencia de *Neospora caninum* en la fauna silvestre no carnívoros de España. *Veterinary Parasitology*. 2007; 143 (1): 21-28. Doi: 10.1016 / j.vetpar.2006.07.027 [PubMed] [Cruz Ref]
3. Baldone N.V., Fuchs L. I., Rojas M del C; Fort M, C., Venturini C; Giménez H, D; (2004). Neosporosis y toxoplasmosis en la liebre europea (*Lepus europaeus*) en la provincia de La Pampa, Argentina. 2004.
4. Barling K.S., McNeill J.W., Paschal J.C., McCollum F.T., Craig T.M., Adams L.G., Thompson J.A. Ranch-management factors associated with antibody seropositivity for *Neospora caninum* in consignments of beef calves in Texas, USA. *Prev Vet Med*. 2001; 52(1): 53-61.
5. Bártová E., Sedlák K., Treml F., Holko I., Literák I. *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* anticuerpos en liebres europeas en la República Checa, Eslovaquia y Austria. *Vet Parasitol*. 15 jul 2010; 171 (1-2): 155-8. doi: 10.1016 / j.vetpar.2010.03.002. Epub Mar de 2010 7.
6. Chapman, J.A. & Flux, J.E.C. (Rabbits, Hares and Pikas). IUCN, Gland, Switzerland. 1990; ISBN 2-8317-0019-1
7. Clarin.com. iEco. En diez años, el negocio de la liebre se redujo a la mitad. Propietario Arte Gráfico Editorial Argentino S.A, 05/04/16. Copyright 1996-2016 Clarín.com - Clarín Digital - Todos los derechos reservados Edición N° 25487.
8. Cossíos D. La liebre europea *Lepus europaeus* (Mammalia, Leporidae), especie invasora en el sur del Perú. *Rev. Per. Biol*. 2004; 11(2): 209-211.

9. De Mares S.T., Liddell J.P., Dubey M.C., Jenkins L., Gasbarre. La infección oral de los terneros con *Neospora caninum* ooquistes de los perros: la respuesta inmune humoral y celular. *Int. J. Parasitol*, 29. 1999; pp. 1647-1657
10. Dubey J.P., Jenkins M.C., Rajendran C., *et al.* Lobo gris (*Canis lupus*) es un huésped definitivo natural para *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 2011; 181 (2-4): 382-387 [PubMed]
11. Dubey J.P., Schares G., Ortega-Mora L.M. Epidemiología y control de la neosporosis y *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev*, 20. 2007; pp. 323-367
12. Dubey J.P., Scharesb G. Neosporosis in animals—The last five years. *Veterinary Parasitology*. 4 august 2011; Volume 180, Issues 1–2. Pages 90–108
13. Ebani V.V., Poli A., Rocchigiani G., Bertelloni F., Nardoni S., Papini R.A., Mancianti F. Serológica encuesta sobre algunos patógenos en la liebre salvaje marrón (*Lepus europaeus*) en el Centro de Italia. *Asia Pac J Trop Med*. Mayo 2016; 9 (5): 465-9. doi: 10.1016 / j.apjtm.2016.03.032. Epub 2016 23 de Mar.
14. Ferroglio Ezio, Trisciuglio Anna. Parasitología veterinaria. Los anticuerpos contra *Neospora caninum* en la liebre europea (*Lepus europaeus*). 10 de julio de 2003; Volumen 115, Número 1, páginas 75-78.
15. Gondim L.F.P., McAllister M.M., Pitt W.C., Zemlicka D.E. Coyotes (*Canis latrans*) son huéspedes definitivos de *Neospora caninum*. *Revista Internacional de Parasitología*. 2004; 34 (2): 159-161. doi: 10.1016 / j.ijpara.2004.01.001 [PubMed] [Cruz Ref]
16. Grigera D.E. & Rapoport E.H. Status and distribution of the European hare in South America. *Journal of Mammalogy*. 1983; 64:163-166.
17. Guido S., Katzer F., Nanjiani I., Milne E., Innes E.A. Diagnóstico de serología-Basado para el control de la neosporosis bovina. *Tendencias Parasitol*. Feb 2016, 32 (2): 131-43. doi: 10.1016 / j.pt.2015.11.014. Epub 2015 17 de Dic.

18. Hughes J.M., Thomasson D., Craig P.S., Georjin S., Pickles Un, Ocultar G. *Neospora caninum*: Detección en conejos silvestres y de investigación de la coinfección por *Toxoplasma gondii* mediante análisis por PCR. Exp. Parasitol. Nov 2008; 120 (3): 255-60. doi: 10.1016 / j.exppara.2008.07.011. Epub 2008 30 Jul.
19. Igarashi M., Oohashi E., Salman D., Mohamed Elsayed A.A., El-Raheem Mottelib A.A., Okada T. Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en conejos en Japón. J Vet Med Sci. Junio 2014; 76 (6): 855-862. Publicado en Internet el 2014 Mar 3. doi: 10.1292 / jvms.13-0632. PMID: PMC4108769
20. Jakubek E.B., Mattsson R., Morner T., Mattsson J.G., Gavier-Widen D. La aplicación potencial de las pruebas serológicas en los fluidos de las canales: la detección de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* y *Sarcoptes scabiei* en zorros rojos (*Vulpes vulpes*). Acta Veterinaria Scandinavica. 2012; 54, artículo 13. doi: 10.1186 / 1751-0147-54-13 [PMC libres artículo] [PubMed] [Cruz Ref]
21. Jenkins M.C., Wouda W., Dubey J.P. Serological response over time to recombinant *Neospora caninum* antigens in cattle after a neosporosis-induced abortion. Clin Diagn Lab Immunol. 1997; 4(3): 270-274.
22. King J. S., Šlapeta J., Jenkins D. J., Al-Qassab S. E., Ellis J. T., Windsor P. A. Australian dingoes are definitive hosts of *Neospora caninum*. International Journal for Parasitology. 2010; 40(8): 945–950. doi: 10.1016/j.ijpara.2010.01.008. [PubMed] [Cross Ref].
23. La Arena, Provincia de La Pampa y centro del país, Argentina. Cuatro Años Exportando Liebres. : info@laarena.com.ar. Archivo - 26/06/2013 5:43 am.
24. Macdonald, D. The New Encyclopedia of Mammals. Oxford University Press. 2001; ISBN 0-19-8550823-9
25. McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Testamentos R.A., McGuire A.M. Los perros son los huéspedes definitivos de *Neospora caninum*.

- Revista Internacional de Parasitología. 1998; 28 (9): 1473-1478. doi: 10.1016 / S0020-7519 (98) 00138-6 [PubMed] [Cruz Ref]
26. Never Bonino. Estado actual del conocimiento sobre la liebre europea y el conejo europeo introducidos en la Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Bariloche, 2006; C.C. 277, 8400 Bariloche (RN). E-mail: nbonino@bariloche.inta.gov.ar
27. Otranto D., Llazari A., Testini G., Traversa D., Di Regalbono A.F., Badan M., Capelli G. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet Parasitol.* 2003; 118(1): 7-18.
28. Rey J.S., Šlapeta J., Jenkins D.J., Al-Qassab S.E., Ellis J.T., Windsor P.A. Dingos australianos son huéspedes definitivos de *Neospora caninum*. *Revista Internacional de Parasitología.* 2010; 40 (8): 945-950. doi: 10.1016 / j.ijpara.2010.01.008 [PubMed] [Cruz Ref]
29. Robbe D., Passarelli A., Gloria A., Di Cesare A., Capelli G., Iorio R., Traversa D. *Neospora caninum* seropositividad y factores de riesgo reproductivo en perros. *Exp Parasitol.* May 2016; 164: 31-5. doi: 10.1016 / j.exppara.2016.02.003. Epub 2016 Feb 10.
30. Sager H., Fischer I., Furrer K., Strasser M., Waldvogel A., Boerlin P., Audige L., Gottstein B. A Swiss case-control study to assess *Neospora caninum*-associated bovine abortions by PCR, histopathology and serology. *Vet Parasitol.* 2001; 102:1-15.
31. Shannon L., Donahoe, Scott A., Lindsay, Krockenberger M., Phalen D., Ene Šlapeta. Una revisión de los hallazgos patológicos de la neosporosis y *Neospora caninum* la infección en los animales salvajes. *Diario Internacional de Parasitología: Parásitos y Vida Silvestre.* Agosto de 2015; Volumen 4, Número 2, páginas 216-238
32. Stenlund S., Kindahl H., Magnusson U., Ugglå A., Björkman C. Serum antibody profile and reproductive performance during two consecutive pregnancies of

- cows naturally infected with *Neospora caninum*. *Vet Parasitol.* 1999; 85: 227-234.
33. Hugo Flores Aybar, 2015. 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
34. Wilson, D.E. & Ruff, S. *The Smithsonian Book of North American Mammals.* Smithsonian Institution Press, Washington in association with the American Society of Mammalogists. 1999; ISBN 1-56098-845
35. Yao L., Yang N., Liu Q., Wang M., Zhang W., Qian W.F., Ding J. Detection of *Neospora caninum* in aborted bovine fetuses and dam blood samples by nested PCR and ELISA and seroprevalence in Beijing and Tianjin, China. *Parasitology.* 2009; 136(11): 1251-1256
36. Zanet S., Palese V., Trisciuglio A., Cantón Alonso C., Ferroglia E. *Cuniculi Encephalitozoon, Toxoplasma gondii y Neospora caninum* en conejos de rabo blanco del este *Sylvilagus floridanus* en el noroeste de Italia. *Vet Parasitol.* 8 de nov de 2013; 197 (3-4): 682-4. doi: 10.1016 / j.vetpar.2013.05.014. Epub 2013 21 de mayo.





**ANEXO N° 1:  
PROYECTO DE TESIS**

**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**MAESTRÍA EN MEDICINA VETERINARIA Y**  
**ZOOTECNIA**



**“RELACIÓN DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS A  
*Neospora caninum* EN LA LIEBRE EUROPEA (*Lepus  
europaeus*) CON LOS ENCONTRADOS EN VACUNOS  
(*Bos taurus*) DEL DISTRITO DE ITE, TACNA 2016”**

Proyecto de Tesis presentado por: el Bachiller  
**MARCOS LEANDRO NEIRA HUAMANI**

Para optar el Grado Académico de:  
**Maestro en Ciencias Veterinarias**

**AREQUIPA – PERÚ**  
**2016.**

## PREÁMBULO

Nuestro país tiene una diversa flora y fauna que coexiste de manera natural en sus diferentes zonas ecológicas, tal condición puede verse afectada por la introducción de especies silvestres invasoras, que han cruzado nuestras fronteras sin ningún control, al desconocerse las enfermedades epidemiológicas que portan, o si intervienen en ciclos biológicos diversos; nos hemos propuesto realizar un estudio, en la Liebre Europea especie invasora, así determinar si es portadora de *Neospora caninum*, (*N. caninum*) aportando conocimiento sobre su rol en la enfermedad, en zonas donde convergen, la fauna nativa, especies domésticas, y especies silvestres invasoras.

### I. PLANTEAMIENTO TEÓRICO

#### 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

##### 1.1 Enunciado del problema.

“Relación de los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* en la liebre europea (*Lepus europaeus*) con los encontrados en vacunos (*Bos taurus*) del distrito de Ite, Tacna 2016”.

##### 1.2 Descripción del problema.

###### 1.2.1 Campo área y línea de investigación.

**Campo:** Medicina Veterinaria.

**Área:** Epidemiología.

**Línea:** Parasitología.

### 1.2.2 Análisis y operacionalización de variables e indicadores

Variables	Niveles	Sub indicadores	Técnica	Instrumento
Niveles de anticuerpos a <i>Neospora caninum</i> en la liebre europea.	Alto Medio Bajo	Densidad Óptica $\geq 30$ Densidad Óptica $\leq 30$	Elisa-C	Lectora de Elisa
Relación entre los niveles de anticuerpos a <i>Neospora caninum</i> en liebres europeas y vacunos	Existe No existe	Alto Dudoso Bajo	Prueba de Pearson	Programa estadístico

### 1.2.3 Interrogantes básicas

- ¿Habrá una relación entre el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* entre las Liebres europeas y vacunos?
- ¿Cuál será el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas del distrito Ite?
- ¿Cuál será el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en vacunos del distrito Ite?

### 1.2.4 Tipo y nivel de investigación.

**Tipo:** correlacional, transversal.

**Nivel:** cuasiexperimental.

## 1.3 Justificación del problema.

En la última década, la liebre europea ha invadido un tercio del territorio peruano sin encontrar barreras naturales que frenen su avance, estableciéndose en valles de la costa y planicies semi desérticas de la sierra. Tal hecho cobra **actualidad** por haber sido declarada la liebre europea, como una amenaza que afecta la biodiversidad y actividades económicas en las áreas donde habita; el

realizar estudios epidemiológicos que permitan establecer su relación con la *Neospora caninum* tiene **relevancia científica** dado que permitirá esclarecer el rol epidemiológico de la liebre europea como portador u hospedero intermediario. La presencia de la liebre europea cobra **importancia** por su velocidad de dispersión, sobrevivencia, nivel de reproducción, adaptabilidad, en este nuevo espacio geográfico, considerándose el presente estudio **original**, no existiendo investigaciones anteriores que hayan evaluado los niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas específicamente su relación con anticuerpos a *Neospora caninum* en vacunos en el Perú, permitiendo aportar nuevos conocimientos sobre el comportamiento de la enfermedad y advertir del riesgo de su presencia, al coexistir con especies domésticas y silvestres, siendo **factible** de realizarse, por encontrarse todas las variables de estudio en el ámbito de la región Tacna.

## 2. MARCO CONCEPTUAL.

### 2.1 Antecedentes.

La distribución natural de la liebre europea, *Lepus europaeus*. Pallas (1778), abarca desde el sur de Suecia y Finlandia y parte de Gran Bretaña hasta las tierras bajas del oeste de Siberia, el norte de Israel, Siria, Irak e Irán (Angermann, 1983), ocupando allí tanto tierras abiertas, preferentemente cerca a tierras cultivadas, como bosques, usualmente caducifolios (Nowak, 1999). Esta especie ha sido introducida y se le encuentra ahora en estado silvestre en numerosas partes del mundo, que incluyen el norte de Europa, Irlanda, sureste de Canadá, noreste de Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y el sur de América del Sur (Lever, 1985).

La llegada de la liebre europea a América del Sur data del año 1888, cuando 36 especímenes fueron introducidos en Quebrada de Gómez, en Santa Fé, Argentina (Grigera y Rapoport, 1983; Daciuk, 1978). Al menos otras tres introducciones se llevaron a cabo posteriormente en el continente.

Según la evaluación hecha por (Grigera y Rapoport en 1983), en ese año la liebre europea ocupaba prácticamente todo el territorio de Argentina y Uruguay, el sur de Brasil (siendo abundante en los estados de Rio Grande do Sul y Santa Catarina), gran parte de Paraguay, el departamento de Tarija en el sur de Bolivia y el territorio Chileno desde su extremo sur hasta el río Copiapó. Según los resultados de esa evaluación, la liebre europea no se encontraba en el Perú el año 1983. (Citado por Cossíos, 2004)

Actualmente la encontramos ocupando prácticamente todo el cono sur Sudamericano, el altiplano Peruano-Boliviano, las áreas semidesérticas de las vertientes occidentales de los Andes y las áreas irrigadas de la costa sur del Perú; mostrando así que ha sobrepasado algunos límites y barreras biogeográficas para las especies nativas, como el río Tambo y los tablazos costeros (Pearson 1982, Sheffield & Thomas 1997, Yensen & Tarifa 2003, Marín *et al.*, 2007).

Las liebres, aunque prefieren primariamente hábitats abiertos, han demostrado una notable plasticidad ecológica en el uso de hábitats y recursos (Kufner *et al.*, 2008), es por ello que las tierras altas de la Puna y los valles costeros parecen jugar un rol de importancia para su dispersión (Jaksic *et al.*, 2002, Bonino *et al.*, 2010). En contraste, los bosques amazónicos y montañas parecen ser una barrera efectiva que evita su expansión. Esta especie fue reportada formalmente en el Perú desde el año 2002 para Tacna y Arequipa (Cossíos 2004 y Llellish *et al.*, 2007, citado por Cossíos 2010). Posteriormente su distribución fue ampliada para los alrededores del lago Titicaca en Puno y la puna sur de Cusco, tanto para localidades alto andinas por debajo de 4400 m, como para la costa de Tacna (Cruz 2005, Canales 2008, Bonino *et al.*, 2010). (Citado por Zeballos H, Medina C, Pino K, Mejía-Ríos A, Pari A)

Actualmente, la liebre europea ya ha sido reportada en el departamento de Arequipa e incluso existe un reporte por confirmar en Ica. En este último departamento, se podría tener severas pérdidas económicas, debido a las amenazas que se ciernen sobre los cultivos de agro exportación que son uno de los pilares de la economía nacional. (Citado por SERFOR, 2015)

## 2.2 Clasificación taxonómica

Liebre común europea *Lepus europaeus*, Pallas, 1778

- Reino: *Metazoa*
- Subreino: Eumetazoa
- Rama: Bilateria
- Grado: Coelomata
- Serie: Deuterostomia
- Phylum: Chordata
- Subphylum: Gnathostomata
- Superclase: Tetrapoda
- Clase: Mammalia
- Subclase: Eutheria
- Superorden: Euarchontoglires
- Orden: Lagomorpha
- Familia: Leporidae
- Género: *Lepus*
- Especie: *europaeus*

## 2.3 Descripción física

Longitud total: 600-750 mm; Longitud de la oreja, 94-102 mm; Cola: 72-110 cm; Pies traseros: 142 a 161 mm; Longitud del cráneo: 96-104 mm; Cráneo ancho: 44-51 mm (Peterson, 1966; Hall y Kelson, 1959). Tienen las orejas largas con puntas negras y que están dentro de un color blanco grisáceo. El pelaje es de color marrón amarillento a marrón grisáceo, con una parte de abajo de color blanco grisáceo. La cara es de color marrón, con anillos del ojo. La cola es de color negro en la parte superior y blanco en la parte inferior. En invierno, *Lepus europaeus* no cambia su pelaje a blanco, pero se convierte en un poco más gris (Peterson, 1966; Bansfields, 1974; Dragg, 1974). No hay dimorfismo sexual observado. El cráneo ofrece, huesos cortos, anchos y pesados, orificios nasales prominentes. También tiene a menudo un proceso subcutáneo prominente del hueso lagrimal, que sobresale de la pared anterior

de la órbita (Bansfield, 1974). (Bansfield, 1974; Dragg, 1974; Hall y Kelson, 1959; Peterson, 1966)

### **2.3.1 Hábitos alimenticios**

Las Liebres europeas son herbívoros, comen pastos, hierbas y cultivos de campo durante el verano. Durante el invierno liebres europeas alimentan de ramas, brotes, la corteza de arbustos, árboles pequeños, y la corteza de los árboles frutales jóvenes. Asimismo a menudo vuelven a ingerir sus heces blandas, bolitas verdes. Esto se conoce como la coprofagia. Dos o tres adultos *Lepus europaeus* puede comer tanta vegetación como una oveja (Banfield, 1974; William y Whitaker, 1943; Peterson, 1966). (Bansfield de 1974); (Hamilton y Whitaker, 1943; Peterson, 1966).

### **2.3.2 La depredación**

Los depredadores conocidos incluyen zorros, lobos, coyotes (en su rango introducido en América del Norte), gatos salvajes, halcones y búhos más grandes, (Bansfield de 1974); (Citado por Vu A., 2001).

### **2.3.3 Tasa de dispersión**

En cuanto a la tasa de dispersión, Grigera y Rapoport (1983) estimaron valores que variaron entre 18,6 y 20 km/año, según el área invadida (hacia el norte o el sur de Argentina) y el punto de liberación considerado (provincia de Buenos Aires en Argentina o región de Última Sitio Argentino de Producción Animal 6 de 9 Esperanza en Chile). Por su parte Cossíos (2004), considerando el Departamento de Tarija (Bolivia) como lugar de origen de las liebres que invadieron Perú, registró una velocidad de dispersión de 44 km/año, aproximadamente.

En este estudio, la tasa de dispersión varió según el área considerada. En Brasil, considerando al estado de Santa Catarina como límite de

distribución en 1982 (Grigera y Rapoport 1983), la tasa promedio de dispersión fue 37 km/año, aproximadamente. En el caso de Perú, si se considera al estado de Tarija (Bolivia) como punto de partida, al igual que lo hiciera Cossíos (2004), la tasa promedio de dispersión fue 34 km/año, ligeramente menor a la estimada para Brasil. Salomone (2006) no da valores del avance de la liebre en Bolivia y en este relevamiento se estimó una tasa promedio de aproximadamente 30 km/año. Finalmente, en Paraguay la tasa de dispersión varió entre 10 y 17 km/año, según la región del país considerada. (Citado por Bonino, Cossíos y Menegheti, 2008).

#### **2.3.4 Hábitat y costumbres:**

Vive en todo tipo de ambientes: alta montaña, bosques abiertos, montes, estepas, pastizales y en áreas cultivadas. Prefieren generalmente zonas abiertas. En cuanto a sus costumbres, es básicamente solitaria, salvo durante la época de reproducción en la cual pueden observarse grupos de 2 o más individuos. Tiene hábitos crepusculares y nocturnos, aunque en los lugares donde no es perseguida también se la observa activa de día. No excava madrigueras; durante el día descansa en “camas” que acondiciona aplastando el pasto y las malezas; allí permanece inmóvil camuflada entre la vegetación, echada con las patas anteriores extendidas y las orejas dirigidas hacia atrás. Siempre está en actitud alerta; en ocasiones se levanta sobre sus patas posteriores y eleva las orejas para vigilar a mayor distancia. Ante el menor sonido o movimiento que indiquen amenaza, escapa velozmente dando grandes saltos, gracias a que sus patas traseras son más largas que las delanteras; nunca se desplaza en línea recta sino que lo hace en zigzag, cambiando bruscamente de dirección para desorientar al perseguidor. Para advertir a otros individuos sobre un peligro puede golpear varias veces el suelo con las patas posteriores y rechinar los dientes produciendo un sonido áspero.

### 2.3.5 Reproducción

La época de reproducción ocurre desde mediados del invierno hasta mediados del verano. Cuando la hembra entra en celo emite un fuerte olor de sus glándulas anales, lo que estimula a los machos y los induce a enfrentarse en duras peleas golpeándose con las patas delanteras y lanzándose patadas con las traseras. La gestación dura entre 30 y 42 días. Cada hembra tiene 2 o 3 pariciones anuales, con 3 a 5 crías por camada. Las crías o lebratos, al nacer pesan unos 100 g, tienen los ojos abiertos y el cuerpo cubierto de pelos. La hembra no prepara ningún tipo de nido para alojar a sus crías; éstas permanecen ocultas entre la vegetación, mientras la madre las vigila a distancia y sólo se acerca a ellas para amamantarlas durante aproximadamente un mes. El macho alcanza la madurez sexual a los 6 meses de edad y la hembra entre los 7 u 8 meses. En cautiverio llega a vivir 7 años. (Citado por Vaccaro O, Canevari M, Carrizo G., 2007)

### 2.3.6 Organización social y comportamiento

Pasan el día encamadas entre la vegetación y comienzan su actividad al atardecer, extendiéndola durante la mayor parte de la noche. En este período son bastante sociables y mantienen una compleja organización social basada en una jerarquía entre individuos establecida mediante persecuciones y posturas intimidatorias. Dedican la mayor parte del tiempo de actividad a la alimentación, aunque lo alternan con períodos dedicados al descanso o a las interacciones sociales. (Citado por Ballesteros F. *et al.*, 1996).

### 2.3.7 Impacto económico y ambiental

La libre europea constituye uno de los ejemplos más interesantes de las consecuencias desastrosas que puede acarrear la introducción, intencional o no, de animales ajenos a medios naturales donde antes no existían. Aunque las comparaciones pueden no ser enteramente válidas,

la experiencia de países como Australia y Nueva Zelanda indica que se trata de una especie que puede llegar a ser sumamente perjudicial en áreas de producción agrícola-ganaderas, además de producir cambios en el ecosistema en perjuicio de especies autóctonas. De acuerdo a los valores de densidad registrados en distintos lugares de la Patagonia, y que varían entre 39 y 57 conejos/ha, el consumo de materia seca oscilaría entre 2320 y 3391 kg/ha/año. Si a este consumo se le suma el pastoreo tradicional del ganado, no es aventurado suponer un deterioro de los pastizales naturales con la consecuente disminución en la capacidad de carga (número de animales que pueden ser alimentados en una superficie determinada sin deteriorar la condición del recurso forrajero) de los campos. Además, el tamaño más pequeño le permite al conejo ser más selectivo que el ganado y pastorear la vegetación herbácea hasta niveles en que es imposible que subsistan otros animales en la misma área. Por otra parte, las especies vegetales no tienen la oportunidad de madurar y propagarse naturalmente, con el resultado de que la vegetación se va empobreciendo paulatinamente, favoreciendo la invasión de plantas indeseables desde el punto de vista forrajero. Esto obliga a una reducción sustancial de la carga animal, con el consiguiente perjuicio económico. En plantaciones forestales en la zona cordillerana de la Patagonia, se han registrado daños cuyos niveles superan el 80% de la plantación. (Citado por Bonino NA, 2009.) Se ha confirmado el daño a diferentes cultivos y la destrucción de mangueras de riego en Tacna (Cruz 2005, Llellish 2007). En la misma zona, varias personas entrevistadas informaron que la liebre les ocasiona problemas al competir con el ganado por la vegetación y por consumir tola (*Baccharis sp.* y *Lepidophyllum sp.*), que es usada tradicionalmente como combustible (Cossíos 2004). (Citado por Cossíos ED, 2010).

## 2.4 La Neospora

### 2.4.1 Introducción

La *Neospora caninum*, agente causal de la neosporosis bovina, es un parásito intracelular obligado descrito por primera vez en cachorros de perro que presentaron parálisis y muerte temprana en Noruega (Bjerkås *et al.*, 1984). Posteriormente el parásito se aisló en perros en los Estados Unidos (Dubey *et al.*, 1988). Se denominó Neospora por ser un nuevo género de coccidia identificada y caninum por ser el perro el primer hospedador en el cual se caracterizó y se aisló. Con respecto a los bovinos, el parásito se identificó por primera vez en ganado lechero con problemas de abortos en los Estados Unidos (Thilsted y Dubey *et al.*, 1989), y el primer aislamiento del agente se realizó en fetos abortados en este mismo país (Conrad *et al.*, 1993). (Citado por Morales S, 2014).

### 2.4.2 Etiología

#### A. Taxonomía

*Neospora caninum* pertenece al phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina, familia Sarcocystidae y género Neospora (Dubey, 1999 2003).

#### Morfología y ultra estructura del parásito

En el ciclo biológico se reconocen tres estadios diferentes: los taquizoítos, los bradizoítos contenidos en quistes tisulares y los esporozoítos encontrados en los esporocistos de los ooquistes. Los taquizoítos tienen un tamaño que oscila entre 3-7micras de longitud y 0.5micras de anchura y una morfología ovoide, globular o lunar, dependiendo de la etapa de división en la que se encuentren (Dubey *et al.*, 2002).

Los bradizoítos son de aproximadamente 6-micras de longitud por 0.8micras de ancho y contienen las mismas organelas que los taquizoítos, aunque en los bradizoítos el número de roptrias es menor y tienen más gránulos de amilopectina (Speer y Dubey, 1989; Jardine 1996). Los quistes, que pueden contener en su interior hasta 200 bradizoítos pueden medir 10 micras de diámetro siendo de forma redondeada u oval. La pared quística (que puede alcanzar más de 0.4 micras de espesor) está formada por dos membranas, la externa, una única membrana electrodensa, y la interna de mayor grosor, granular y con estructuras tubulares (Bjerkas y Dubey, 1991).

Los esporozoítos tienen 6,5 micras de longitud por 2,0 micras de ancho y se encuentran en número de cuatro dentro de dos esporocistos contenidos en los ooquistes. Los ooquistes de *Neospora. caninum* son morfológicamente similares a los de *Toxoplasma. gondii* y *H. heydomi*; tienen forma esférica o sub esférica y su tamaño es de 11,7 micras de longitud y 11,3 micras de anchura. La pared del ooquiste es lisa, de 0,6-0,8micras de espesor y no contiene micropilo (Bjerkas y Dubey, 1991; Dubey *et al.*, 2002). (Citado por Prando M, Venturini MC, Campero CM. 2006).

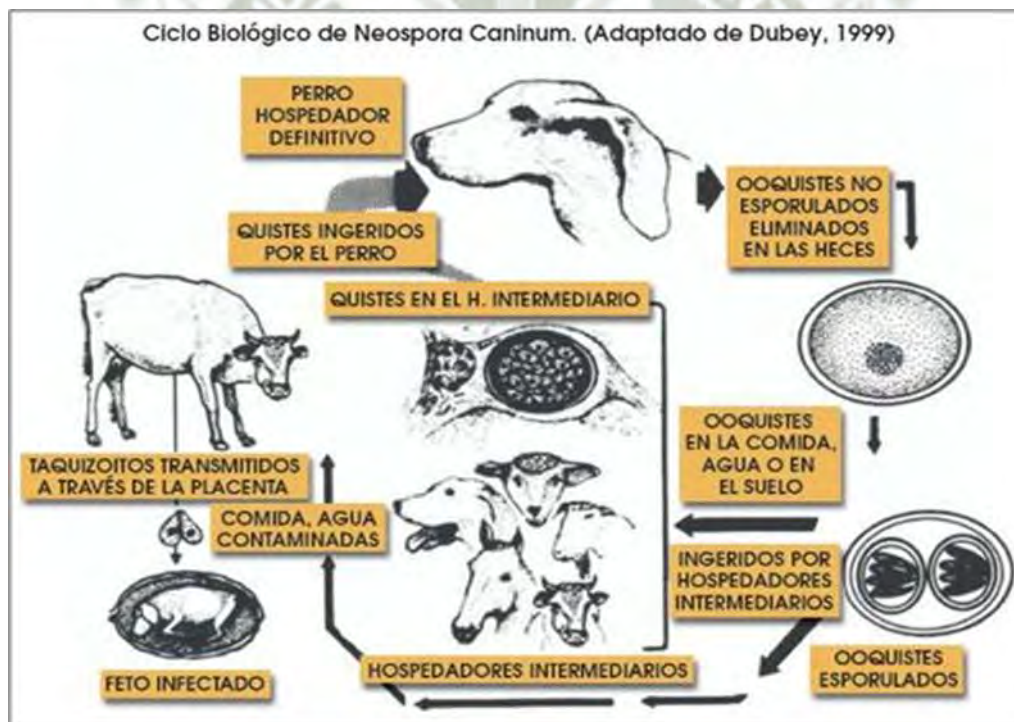
#### **B. Ciclo de vida y transmisión:**

Los hospedadores definitivos adquieren la infección al ingerir tejidos de hospedadores intermediarios conteniendo quistes. La pared del quiste es degradada por los jugos gástricos liberando las formas parasitarias que iniciarán los estados entero-epiteliales. Luego de realizar una fase de reproducción asexual y sexual en el intestino, los ooquistes son eliminados en las heces del hospedador definitivo. Los perros que consumen tejidos infectados pueden eliminar ooquistes manteniendo su condición de seronegativos. Por otro lado, un canino que se comporte como hospedador intermediario puede ser seropositivo y transmitir la infección

verticalmente a sus cachorros o presentar, miositís, parálisis y dermatitis. La frecuencia con la cual los perros pueden adquirir la infección en la naturaleza es motivo de debate, sin embargo, la exposición postnatal de los caninos está demostrada por el incremento de la seroprevalencia en perros de mayor edad, siendo infectivos a las 24 horas. después de su eliminación en las heces, los ooquistes ingresan a los hospedadores intermediarios por la vía oral.

Los esporozoítos liberados en el aparato gastrointestinal del hospedador intermediario son capaces de alcanzar las vías sanguínea y linfática accediendo a todos los tejidos, no obstante sólo se ha informado la presencia de quistes en el sistema nervioso central (SNC) y el tejido muscular. Aunque el bovino puede infectarse por la vía oral siendo el ciclo de vida heteroxeno, la principal vía de transmisión es la congénita. Esta vía ha sido también demostrada experimentalmente en ovinos, caprinos, ratones, caninos, felinos, porcinos y primates. Por otro lado, si bien la transmisión vertical es la forma de infección más frecuente en bovinos, ello no explicaría debidamente el elevado número de hatos infectados. El hecho de haberse determinado que los bovinos pueden tener seroconversión por una exposición postnatal avala la importancia de la transmisión horizontal, motivando intensa investigación el descubrimiento de otras vías de infección postnatal. Además, la transmisión vertical no sería un mecanismo suficiente para mantener la infección en una población bovina debido a que su eficiencia es inferior al 100%. En una hembra bovina, luego de una infección oral (infección exógena) o por reactivación de quistes tisulares en estado de latencia adquiridos congénitamente (infección endógena), el parásito alcanza la vía sanguínea y es capaz de atravesar la placenta accediendo al feto. Luego de invadir el feto, puede ocasionarse el aborto o la transmisión vertical con nacimiento de un ternero clínicamente normal pero congénitamente infectado. El protozoo puede ser eliminado a través del semen en toros y su

ácido desoxirribonucleico (ADN) ha sido ocasionalmente detectado en muestras de semen congelado. Aunque los toros se comportan como hospedadores intermediarios sería poco probable la ocurrencia de transmisión venérea; sin embargo, esta posibilidad aún no ha sido investigada. Considerando que los taquizoítos adicionados artificialmente a la leche resultaron infectivos para terneros, la eliminación del protozoo a través de la glándula mamaria debería ser motivo de investigación. En el parto o tras el aborto, la placenta con presencia de taquizoítos podría servir como fuente de infección para otra vaca que la ingiera. Sin embargo, dos terneros y dos vacas libres de *Neospora caninum*, mantuvieron dicha condición luego de consumir placenta naturalmente infectadas.



**Figura N° 1:** Ciclo de vida de *Neospora caninum* (adaptado de Dubey, 1999)

El hecho de haberse informado que el coyote puede comportarse como hospedador definitivo y que otras especies, como por ejemplo los ciervos, pueden servir como hospedadores intermediarios, avalan la existencia de ciclos de vida silvestre de *Neospora*

*caninum*. Si bien existen evidencias de exposición natural y experimental a *Neospora caninum* en otros cánidos salvajes y aves, el riesgo epidemiológico de estas especies es aún desconocido. (Citado por Venturini MC, Odeón AC, Moore DP, Campero CM).

### 2.4.3 El Perro y Otros Cánidos Carnívoros

La transmisión horizontal puede ser por consecuencia de la ingestión de tejidos infectados de huéspedes intermediarios que contienen quistes tisulares, o de alimentos contaminados con ooquistes esporulados o agua (Dubey *et al.*, 2006, 2007). Los perros han demostrado arrojar ooquistes tras el consumo de vísceras infectadas o membranas de la placenta expulsados de las vacas infectadas (Williams *et al.*, 2009). La transmisión vertical también se produce en los perros. Perras infectadas pueden transmitir parásitos *Neospora caninum* a sus crías en camadas sucesivas; sin embargo, la infección transplacentaria por sí sola se considera menos importante en el mantenimiento de la infección en las poblaciones caninas (Barber y árboles, 1996; Dubey, 2003; Dubey *et al.*, 2005, 2006, 2007; Reichel *et al.*, 2007; Dubey y Schares, 2011; Goodswen *et al.*, 2013).

Experimentalmente hay pruebas de que la transmisión lactogénica se produce en terneros, pero este modo de transmisión no se ha demostrado en circunstancias naturales en esta especie o en perros (Davison *et al.*, 2001; Dijkstra *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2007).

A nivel mundial, los estudios indican que el ciclo de vida del *Neospora caninum* se mantiene en un ciclo doméstico entre perros y ganado (Dubey *et al.*, 2007). Ellos muestran una fuerte correlación entre la presencia de los perros domésticos y la incidencia de la neosporosis en las establos de ganado (McAllister *et al.*, 1998; Sawada *et al.*, 1998; Wouda *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 2001; Moore *et al.*, 2002, Otranto *et al.*, 2003; Hobson *et al.*, 2005; Wanha *et al.*, 2005; Bartels *et al.*, 2007;

Dubey *et al.*, 2007; Malmasi *et al.*, 2007; Collantes-Fernández *et al.*, 2008).

En América del Norte, se tiene datos consistentes de la presencia de un ciclo silvestre de *Neospora caninum* entre los cérvidos y cánidos, que involucra al venado de cola blanca, (*Odocoileus virginianus*) y cánidos domésticos (Rosypal 2005., Gondim 2006)., varios estudios han demostrado una elevada seroprevalencia de *Neospora caninum* en el venado cola blanca. Dubey *et al.*, 2013, indica que *Neospora caninum* viable se ha aislado de este huésped, Vianna *et al* 2005., es muy importante, indicar que los perros eliminaron ooquistes de *Neospora caninum* después de ser alimentados, con cerebros de venados de cola blanca que contrajeron la enfermedad de forma natural Gondim, *et al* 2006. Posteriores estudios, con el fin de determinar si los ciervos podían transmitir *Neospora caninum*, alimentaron 4 perros con cerebros infectados de forma natural, procedentes de venado cola blanca, resultaron que 2 de estos perros eliminaron ooquistes. (Dubey *et al.*, 2007, los rebaños de carne de América del Norte que son pastados en las proximidades de coyotes tienen un mayor riesgo de infección con *Neospora caninum*, lo que significa que la transmisión puede ser de origen entre estas especies (Barling *et al.*, 2000; Gondim *et al.*, 2004; Dubey *et al.*, 2007). La identificación de los bovinos seropositivos de áreas en las que los perros domésticos no están presentes, proporciona evidencia adicional para apoyar la posibilidad de un ciclo de transmisión selvática entre los cánidos salvajes y ganado (McAllister *et al.*, 1998; Ferroglio *et al.*, 2003; Gondim *et al.*, 2004b). (Citado por Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, y Šlapeta N.).

#### 2.4.4 Patogenia.

La neosporosis bovina tiene una patogenia compleja en la que influyen múltiples factores dependientes del medio ambiente, hospedador y del parásito. Se trata principalmente una enfermedad de la placenta y del feto, iniciada tras una parasitemia, ya sea como resultado de una

infección materna primaria (exógena) o por la recrudescencia durante la gestación de una infección persistente (endógena). (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2002). Tras la ingestión de ooquistes esporulados (Transmisión transplacentaria exógena) (de Marez, *et al.*, 1999; Gondim *et al.*, 2004), los esporozoítos son liberados en el intestino delgado, parasitan el epitelio y se transforman en taquizoítos. Estas formas son las responsables de la fase aguda de la infección e iniciarán una etapa de multiplicación rápida en los linfonódulos mesentéricos para luego ser liberados al torrente circulatorio y de esta forma, alcanzar diferentes tejidos (Dubey *et al.*, 2006). Okeoma *et al.*, (2004) demostraron ADN de *Neospora caninum*, en leucocitos sanguíneos de un bovino naturalmente infectado. El resultado de la parasitemia es la diseminación por diferentes tejidos, inclusive útero grávido. Luego se multiplican intracelularmente por endodiogenia, (Dubey; Lindsay, 1996). Experimentalmente la parasitemia ha sido difícil de detectar, debido a la corta y pulsátil duración (Maley *et al.*, 2003; Macaldowie *et al.*, 2004). La severidad de la infección dependerá de la capacidad del taquizoíto para penetrar y multiplicarse en las células y la habilidad del hospedador para inhibir la proliferación del parásito. La multiplicación intracelular del parásito causa la destrucción tisular. Como consecuencia de estos focos de necrosis, se produce además una reacción inflamatoria con células mononucleares (Buxton *et al.*, 2002).

Con el comienzo del desarrollo de la respuesta inmune del hospedador, los taquizoítos se diferencian en bradizoítos dentro de los quistes tisulares ocasionando una infección persistente (Buxton *et al.*, 2002).

Durante la fase crónica de la infección los quistes tisulares con bradizoítos no ocasionan una acción patógena destacada, por lo que el animal no manifiesta ninguna signología. Sin embargo, los bradizoítos alojados en los quistes tisulares del SNC en una hembra gestante pueden reactivarse bajo ciertas influencias hormonales e inmunológicas y transmitir la infección al feto (transmisión transplacentaria endógena).

Esta forma de transmisión sería el modo de transmisión más común en bovinos (Björkman *et al.*, 1996; Anderson, *et al.*, 1997). En estos casos, los bradizoitos se liberarían de los quistes transformándose en taquizoitos originando una nueva fase aguda de infección (Quinn *et al.*, 2002). Las causas que provocan la muerte del feto parecen ser multifactoriales y no se conocen con detalle. Dubey y Porterfield (1990) señalaron que la muerte del feto podría ser debida a una miocarditis. Sin embargo, otros autores han postulado que las lesiones en el SNC serían las principales responsables (Barr *et al.*, 1990). Aun así, en muchas ocasiones no se han encontrado graves lesiones en los órganos vitales por lo que la muerte del feto parece depender también de otros factores. En este sentido, se ha sugerido la importancia de la respuesta inmune celular desarrollada por las hembras gestantes, principalmente durante el periodo inicial de gestación. En la gestación se produce un estado de inmunodepresión concretamente en la placenta, con el fin de evitar el rechazo del feto. Las citoquinas pro-inflamatorias del tipo Th1 (IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) que podrían provocar el rechazo del feto están inhibidas y predominan las de tipo Th2 como la IL-10 o el factor de crecimiento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Esta situación beneficiaría la multiplicación del parásito y facilita la destrucción focal de la placenta, tanto materna como fetal, así como el desarrollo de una respuesta inflamatoria. En consecuencia de la multiplicación del parásito se desencadenaría una respuesta Th1 en la madre para controlar la replicación del patógeno, la cual puede ser letal para el feto (Buxton *et al.*, 2002; Innes *et al.*, 2002; Quinn *et al.*, 2002). Asimismo, se ha sugerido que la muerte fetal podría producirse directamente por la invasión del placentoma por el parásito y el consiguiente daño tisular, interrumpiéndose de esta forma el intercambio de oxígeno y nutrientes. En este sentido, se ha descrito la presencia de lesiones y del parásito en la placenta, tanto en vacas con infección natural (Shivaprasad *et al.*, 1989; Thilsted; Dubey, 1989; Boulton *et al.*, 1995; Bergeron *et al.*, 2001) como experimental (Barr *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 2001).

Infecciones experimentales en hembras bovinas preñadas han demostrado que la muerte fetal ocurrió cuando las mismas fueron desafiadas con taquizoitos de *Neospora caninum*, en el día 70 de gestación (Williams *et al.*, 2000; Macaldowie *et al.*, 2004), mientras que el desafío a mediados gestación resultó en la transmisión vertical del parásito sin comprometer la vida del feto (Almería *et al.*, 2011; Bartley *et al.*, 2004). Estas observaciones sugieren que la distribución de la parasitemia durante la gestación es fundamental en las consecuencias clínicas y que lo más probable es que la misma se vea influenciada por la respuesta inmune al parásito tanto materna como fetal. Trabajos realizados por Williams *et al.*, (2000); Collantes-Fernández *et al.*, (2006) y Rosbottom *et al.*, (2007) se apoyan esta conclusión. En un estudio reciente (Bartley *et al.*, 2012) se demostró que la generación de una respuesta materna, tanto periférica como local, mediada por células puede inhibir de manera experimental la transmisión vertical del parásito.

A su vez resultados obtenidos tanto en infecciones naturales como experimentales, han demostrado que la edad gestacional determina el desenlace de la infección. En investigaciones realizadas en vacas con infección natural, Dannatt (1997) y Paré *et al.*, (1997) describieron un aumento en el título de anticuerpos en los meses 5, 6 y 7 de gestación que podría estar relacionado con un mayor estímulo antigénico procedente de la multiplicación del parásito en el feto. Stenlund *et al.*, (1999) estudiaron fluctuaciones de anticuerpos antes, durante y después del parto, observando también un aumento en el título de anticuerpos 4-5 meses antes del parto, que disminuían dos meses después. Por su parte, Quintanilla-Gozalo *et al.*, (2000) y Pereira-Bueno *et al.*, (2000) estudiaron las fluctuaciones de anticuerpos durante la gestación en 32 vacas seropositivas, de las cuales sólo abortaron 10. Se observó un incremento en el título de anticuerpos durante el segundo trimestre, más acusado en las vacas que abortaron y durante el tercer tercio en las vacas que tuvieron terneros congénitamente infectados. Posteriormente,

se han realizado observaciones similares; Guy *et al.*, (2001) estudiaron la gestación de 9 vacas gestantes crónicamente infectadas. Los valores de anticuerpos observados alcanzaron niveles elevados, unos días antes de producirse la muerte fetal en las vacas que abortaron y entre las semanas 22 y 36 de gestación en las vacas que tuvieron terneros congénitamente infectados. Mientras que las vacas que parieron terneros no infectados, no tuvieron fluctuaciones de anticuerpos durante la gestación.

Por otra parte, los resultados obtenidos en infecciones experimentales han demostrado que en función del periodo de gestación en el que se realice la inoculación del parásito, puede producirse la muerte fetal, el nacimiento de terneros con transmisión congénita o bien el de terneros no infectados. El efecto de la infección antes del comienzo de la gestación ha sido poco estudiado y parece dar lugar al nacimiento de terneros no infectados (Williams *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001). Sin embargo la infección durante la primera fase de la gestación suele producir la muerte fetal (Dubey *et al.*, 1992; Barr *et al.*, 1994a; Williams *et al.*, 2000); como ejemplo valga comentar que la inoculación de 6 vacas con taquizoitos por vía intravenosa (i.v) en el día 70 de gestación, causó la muerte de 5 fetos en la semana 13 (Williams *et al.*, 2000). La inoculación de taquizoitos en el segundo tercio de gestación tiene consecuencias variables, produciéndose, en la mayoría de los casos, la infección del feto y no su muerte (Barr *et al.*, 1994; Innes *et al.*, 2001; Almería *et al.*, 2003; Maley *et al.*, 2003). La inoculación en el último tercio ha dado lugar al nacimiento de terneros congénitamente infectados (Williams *et al.*, 2000). En los terneros congénitamente infectados, las lesiones localizadas en los músculos y en el SNC serían las responsables de los signos neurológicos y neuromusculares observados ocasionalmente (Barr *et al.*, 1991a; Dubey; Bryan *et al.*, 1994). En el animal adulto sólo se ha observado experimentalmente una respuesta febril y un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos a los pocos días de la inoculación del parásito (Innes

*et al.*, 2001; Maley *et al.*, 2001, 2003). (Citado por Rodríguez AM, 2015).

#### 2.4.5 Signos clínicos

##### A. Neosporosis bovina

La infección por *Neospora caninum* en el ganado bovino no gestante es generalmente asintomática, mientras que en animales preñados tiene como signo clínico más relevante el aborto, tanto en el ganado bovino lechero como en el de carne (Dubey, 2005). Asimismo, una misma vaca puede abortar repetidas veces por neosporosis (Anderson *et al.*, 1995), pudiendo ocurrir a partir del tercer mes de gestación aunque suele observarse más frecuentemente entre los 5 y los 6 meses (Dubey y Lindsay, 1996; Dubey, 1999). Dentro del rebaño, la presencia de abortos puede ocurrir en cualquier época del año (Thurmond *et al.*, 1995; Wouda *et al.*, 1998) y presentarse de manera epidémica, endémica o esporádica (Thurmond *et al.*, 1997; Dubey, 1999). Existe evidencia de una fuerte asociación entre abortos epidémicos y primoinfecciones con *Neospora caninum* (Thornton *et al.*, 1994; Yaeger *et al.*, 1994; Thurmond y Hietala, 1997; Moen *et al.*, 1998; Wouda *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2000), mientras que la transmisión transplacentaria endógena estaría asociada a casos de aborto endémico (Thurmond *et al.*, 1997; Schares *et al.*, 2002a). En estos casos, la recrudescencia de la enfermedad se señala como la responsable de la presentación de abortos (Pare *et al.*, 1997; Stenlund *et al.*, 1999). También se han descrito otras consecuencias de la neosporosis bovina sobre el feto, tales como su muerte y reabsorción en el útero momificación o autólisis (Dubey, 2005), el nacimiento de terneros muertos, vivos pero con sintomatología nerviosa o clínicamente normales pero congénitamente infectados (Hemphill, 1999; Buxton *et al.*, 2002). La presencia de signos clínicos debidos a neosporosis solo ha podido ser observada en

terneros menores de 4 meses, con diversos grados de sintomatología nerviosa incluyendo ataxia (Dubey y Schares, 2006). Por otro lado, desde los estudios de Paré *et al.* (1996) se sabe que hasta un 95% de las crías nacidas de madres serológicamente positivas pueden estar infectadas congénitamente aunque permanecer clínicamente sanas.

Además del aborto, es posible encontrar lesiones asociadas a la neosporosis en diversos órganos, dependiendo de la etapa y gravedad de la infección. En los fetos abortados es frecuente observar una encefalitis multifocal necrótica no purulenta con manguitos perivasculares (Barr *et al.*, 1991; Dubey y Lindsay, 1996), junto con miocarditis y hepatitis difusa (Barr *et al.*, 1993; Wouda *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha observado que en la placenta puede haber focos de necrosis que progresan hacia la hiperplasia, fibrosis y calcificación (Barr *et al.*, 1994; Maley *et al.*, 2003). En terneros y ganado adulto también es posible encontrar lesiones, aunque con menor frecuencia y magnitud (Barr *et al.*, 1991; Bryan *et al.*, 1994; Sawada *et al.*, 2000). En ese sentido, se ha descrito encefalomiелitis no purulenta en terneros y la observación y lesiones perivasculares en vacas adultas. En cuanto a la observación de taquizoítos o quistes tisulares en los tejidos con lesiones, esta ocurre principalmente en el sistema nervioso central (Dubey y Lindsay, 1996) y con menor frecuencia en el corazón (Morales *et al.*, 2001), el hígado (Wouda *et al.*, 1999) y en la musculatura esquelética (Peters *et al.*, 2001). (Citado por Risco CV, 2008).

## **B. Neosporosis canina**

Los signos clínicos asociados a esta parasitosis canina son similares a los encontrados en otras enfermedades de protozoarios, como la toxoplasmosis. Sin embargo en la neosporosis se describe un predominio de anomalías musculares y neurológicas (Greene, 1990), existiendo presentaciones inusuales, como por ejemplo de

dermatitis (Dubey, 1999). Los cachorros y los perros más viejos son los que pueden ser afectados (Dubey, 1990; Greene, 1990), sin embargo la mayoría de los casos clínicos, siendo los más severos, corresponden a perros jóvenes infectados congénitamente (Greene, 1990; Dubey y Lindsay, 1993; Dubey, 1990; 1999). Así por ejemplo en perros adultos, se han descrito signos multifocales del sistema nervioso central, polimiositis, miocarditis y dermatitis (Dubey, 1990; Greene, 1990), en tanto que en perros jóvenes o cachorros se han presentado signos de parálisis ascendente, siendo los miembros posteriores los más severamente afectados (Dubey, 1990; Greene, 1990; Dubey y Lindsay, 1993).

Otras disfunciones descritas en perros jóvenes, incluyen disfagia, parálisis de la mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e incluso falla cardíaca. En cuanto a lesiones es posible observar focos multifocales de necrosis y mineralización en músculos, especialmente en el diafragma. Existe además hepatomegalia, neumonía y signos de malacia en el sistema nervioso central. Al igual que en bovinos, histopatológicamente existe una encefalomiелitis no supurativa, miocarditis, hepatitis y miositis. (Citado por Albeitar, 2003).

### C. Neosporosis en ovejas

*Neospora caninum* fue diagnosticado por primera vez en un cordero infectado congénitamente en Inglaterra, (Dubey *et al.*, 1990). Históricamente, este fue el primer caso de *Neospora caninum* (Hartley y Puente, 1975). El cordero nació débil, parcialmente tuvo atáxica, y murió a la semana de vida. Posteriormente, la neosporosis ovina clínica se informó en Japon. Kobayashi *et al.*, (2001) encontrando neosporosis en una oveja y su feto gemelo infectada de manera natural. Encefalitis focal y quistes tisulares se observaron en los tres animales. Koyama *et al.*, (2001) obteniéndose así el primer aislamiento de *Neospora caninum* en una oveja adulta.

Poco se conoce de la seroprevalencia de *Neospora caninum* en el ganado ovino que contrajo la enfermedad de forma natural, un estudio reciente en el Reino Unido observó en 3 de 660 ovejas que habían abortado la presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* (Helmick *et al.*, 2002). Sin embargo las ovejas son altamente susceptibles a la infección experimental con taquizoitos de *Neospora caninum*.

#### **D. Neosporosis en los caballos**

*Neospora caninum* se han encontrado en los tejidos de dos potros abortados (Dubey y Porterfield, 1990; Pronost *et al.*, 1999), un potro congénitamente infectado (Lindsay *et al.*, 1996b) y cinco caballos adultos. (Gray *et al.*, 1996; Daft *et al.*, 1996; Marsh *et al.*, 1996; Hamir *et al.*, 1998; Cheadle *et al.*, 1999b). Marsh *et al.*, (1998) propusieron un nuevo nombre para el parásito del caballo, *Neospora hughesi*, en 1996 se informó de tres aislamientos de *N. hughesi* en caballos adultos, que fueron reportados por (Marsh *et al.*, 1998; Cheadle *et al.*, 1999b; Dubey *et al.*, 2001). Se han informado de las características moleculares y biológicas de estos tres aislamientos (Cheadle *et al.*, 1999a; Walsh *et al.*, 2000; Dubey *et al.*, 2001; Marsh *et al.*, 2001) Los quistes tisulares de *Neospora hughesi* son de menor tamaño que *Neospora caninum*, el quiste tienen paredes más delgadas (menos de 1,0 µm de espesor), y los bradizoítos son más pequeños que los de *Neospora caninum* (Marsh *et al.*, 1998)., sin embargo a un no es claro si *Neospora hughesi* es la única especie de *Neospora* que infecta a los caballos.

#### **Neosporosis en seres humanos.**

Debido a que dos monos rhesus (*Macaca mulata*) han sido infectadas con éxito con *Neospora caninum* (Barr *et al.*, 1994), existe una preocupación sobre el potencial zoonótico de *Neospora caninum*. Sin embargo, en la actualidad no hay evidencia de que

*Neospora caninum* infecte con éxito los seres humanos. En conclusión, no hay evidencia que la infección a *Neospora caninum* sea zoonótica.

#### **E. Neosporosis en carnívoros**

Los carnívoros han sido ampliamente investigados por eliminar ooquistes de *Neospora caninum*, lo que implica un papel potencial como huéspedes definitivos de *Neospora caninum*. oocistos de origen natural de *Neospora caninum* se han identificado sólo en coyotes de América del Norte (*Canis latrans*) (Gondim *et al.*, 2004b; Wapenaar *et al.*, 2006), los híbridos de los perro dingo domésticos que viven en remotas comunidades aborígenes en Australia (King *et al.*, 2010, 2012), y gris lobos (*C. lupus lupus*) (Dubey *et al.*, 2011).

La enfermedad en los carnívoros no domésticos sólo se han descrito en animales jóvenes aunque las manifestaciones clínicas y las lesiones patológicas varían entre estos casos, se han reportado presentaciones neurológicas y dermatológicas similares a los encontrados en perros domésticos.

#### **F. Neosporosis en fauna**

Neosporosis fue diagnosticado en la autopsia en dos ciervos de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) procedentes de estado salvaje que encontraron muertos en California (Woods, *et al.*, 1994), en un ciervo en cautividad en zoológicos en Francia (Dubey *et al.*, 1996b, y Alemania (Peters *et al.*, 2001b. Neosporosis se informó en una ternera de rinoceronte (*Ceratotherium simum*) (Williams *et al.*, 2002). El animal murió de repente pudiendo ser debido a miocarditis.

## G. Lagomorpha

Anticuerpos y / o ADN *Neospora caninum* se han encontrado en los siguientes lagomorfos criados en libertad: conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (ADN) (Ibrahim *et al.*, 2009), liebre ibérica (*Lepus granatensis*), (Almería *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2008), en la liebre (*Lepus europaeus*), (Ezio y Anna, 2003; Bartova *et al.*, 2010), en los conejos de rabo blanco del este (*Sylvilagus floridanus*) (ADN) (Zanet *et al.*, 2013).

## H. Aves

El papel de las aves en el ciclo de vida de la *Neospora caninum* es incierto. Una correlación positiva se ha demostrado entre la presencia de aves, y el ganado. Las que aumentan del riesgo de la seroprevalencia *Neospora caninum*, asociándolas al incremento de abortos, sugiriendo que las aves pueden contribuir a la transmisión del parásito en los ciclos silvestres ya sea como vectores mecánicos o como huéspedes intermediarios (Bartels *et al.*, 1999; Uld-Amrouche *et al.*, 1999; Otranto *et al.*, 2003).

## Pruebas de Diagnóstico.

### A. Histopatología e inmuno histoquímica

La histopatología tiene una baja sensibilidad para la detección de organismos en comparación con otras pruebas de diagnóstico disponibles, porque las etapas de la vida del parásito no siempre están presentes o se observan fácilmente en la sección del tejido (Dubey y Schares, 2006). Sin embargo, la histopatología sigue siendo una herramienta de diagnóstico muy valiosa que es esencial para mejorar nuestra comprensión de los resultados de la infección en las especies silvestres. Permite la descripción de la lesión, el análisis de la distribución tisular, y la identificación de la patología concomitante con parásitos, la documentación de una asociación

entre la presencia de parásitos y enfermedades. Debido a que no es posible distinguir definitivamente los diferentes tejidos que forman quistes de coccidios mediante el estudio histopatológico del tejido, pruebas diagnósticas confirmatorias adicionales deben llevarse a cabo en conjunción con la histopatología.

## **B. Seroprevalencia**

Las técnicas serológicas para la detección específica de *Neospora caninum* en animales domésticos son la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI), inmunotransferencia (IB), la prueba directa de aglutinación (NAT), y una variedad de pruebas de inmunoabsorción ligados (ELISA) (revisado por Dubey y Schares, 2006). En la vida silvestre, las pruebas serológicas más comúnmente utilizados son el ensayo competitivo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISAc) y *Neospora caninum* prueba -agglutination (NAT), ya que estas técnicas no requieren el uso de especies de anticuerpos secundarios específicos (Almería, 2013). (Citado por Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, y Šlapeta N, 2015).

## **C. Enzimoimmunoensayo (ELISA)**

La prueba de ELISA ha sido ampliamente utilizada en el serodiagnóstico de la neosporosis. La facilidad para procesar un gran número de muestras, por su sensibilidad y especificidad superior a las obtenidas con la IFI, sumado a la falta de subjetividad cuando se debe emitir un resultado, hacen confiable esta prueba (Paré *et al.*, 1997). El título de corte o el valor de absorbancia asignado a una prueba es motivo de controversia ya que depende de factores tales como la composición del antígeno, anticuerpos identificados y de los conjugados utilizados (Dubey *et al.*, 1997). Un determinado título o valor de corte debería ajustarse a cada circunstancia o situación epidemiológica (Dubey *et al.*, 1999).

#### D. Elisa competitivo

Los métodos de ELISA competitivos son usados generalmente para detectar la presencia de antígeno. El anticuerpo, específico al antígeno que se quiere detectar, se adhiere a una fase sólida. El antígeno ligado a la enzima y el antígeno (en la muestra) que será analizado se añaden a la fase sólida y compiten por los sitios de enlace en el anticuerpo. El complejo antígeno-anticuerpo ligado a la enzima se incuba con el sustrato de la enzima, que ligada reacciona con su sustrato para producir un color; la lectura puede hacerse espectrofotométricamente. La cantidad de hidrólisis del sustrato es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra.

#### E. ELISA de avidéz

La presencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en el suero indica que un individuo está infectado por el parásito. A su vez, los anticuerpos pueden persistir por largos períodos de tiempo y presentar fluctuaciones a lo largo del tiempo (Jenkins *et al.*, 1997; Stenlund *et al.*, 1999; Sager *et al.*, 2001). Sin embargo los niveles de anticuerpos o el aumento de los títulos no pueden ser usados para estimar si un individuo sufre de neosporosis aguda o crónica. Una de las formas para la identificación de infecciones recientes es midiendo la avidéz que tienen los anticuerpos para unirse con antígenos específicos de *Neospora caninum*. Esta avidéz es inicialmente limitada pero se incrementa lentamente a medida que transcurren las semanas siendo este concepto utilizado para diagnosticar infecciones a *T. gondii* (Hedman *et al.*, 1989) y rubéola en humanos (Rousseau; Hedman, 1988) permitiendo distinguir infecciones recientes de infecciones preexistentes, pasadas o viejas.

La prueba de avidéz está basada en el hecho de que el agregado de urea durante el desarrollo del ELISA disocia las uniones débiles de

los anticuerpos mientras que los anticuerpos con alta avidéz permanecen firmemente acoplados al antígeno. De esta forma, la prueba permite distinguir infecciones primarias o recientes (con pobre unión Ag-Ac) de las infecciones preexistentes (con fuertes uniones Ag-Ac). Una comparación de ELISAs de avidéz fue realizada por Björkman *et al.*, (2006). Anticuerpos con baja avidéz indicarían una infección reciente y son frecuentemente encontrados en casos de abortos epidémicos como consecuencia de una transmisión horizontal, mientras que la alta avidéz en los anticuerpos puede ser usualmente detectada en animales que han contraído la infección tiempo atrás. Esto implicaría que la alta avidéz de los anticuerpos puede ser resultado de una infección transplacentaria como resultado de una transmisión vertical.

Björkman *et al.*, (1999) trabajando con sueros pareados de terneros experimentalmente infectados con *Neospora caninum* evidenciaron que la avidéz se incrementó significativamente durante el curso de la infección. La avidéz de los anticuerpos fue estimada por primera vez a las tres semanas de la inoculación inicial, a las 6 semanas los valores de avidéz se ubicaron entre el 21% y el 33% en todos los animales del ensayo. Valores altos de avidéz solo pudieron demostrarse a las 8 semanas post inoculación, confirmando que ello podría utilizarse como un método indirecto para determinar que la respuesta no correspondería a una infección reciente. El uso del ELISA de avidéz contra *Neospora caninum* en investigaciones de brotes de abortos y partos prematuros en rodeos de bovinos para carne, reveló un incremento en la avidéz promedio específica para anticuerpos IgG entre el día 14 y 85 post-brote de abortos. (McAllister *et al.*, 2000). (Citado por Rodríguez Alejandro M; 2015).

## F. PCR convencional y anidada

PCR es una técnica altamente sensible y específico para la detección de *Neospora caninum* DNA que se puede aplicar a los tejidos y otras muestras clínicas, tales como sangre, CSF, y otros fluidos corporales. El *Neospora caninum* repetitivo gen específico Nc5 y la región de espaciador transcrito interno 1 (ITS1) del gen de rRNA son los marcadores más comunes que se utilizan para la rutina basada en PCR *Neospora caninum* detección (Dubey y Schares de 2006). El gen ITS1 es un objetivo útil para el análisis filogenético entre los taxones estrechamente relacionados (por ejemplo, *Toxoplasma*, *Hammondia*, y *Neospora*) ya que está presente en el alto número de copias en el genoma y exhibe variabilidad entre especies y la conservación dentro de las especies, lo que permite la diferenciación entre *Neospora caninum* y otras especies de coccidia (Holmdahl y Mattsson, 1996; Dubey *et al.*, 2002, Gondim *et al.*, 2004c;.. Al-Qassab y otros, 2010).

## G. PCR cuantitativa.

En la actualidad, la PCR cuantitativa para *Neospora caninum* sólo se utiliza en la investigación académica, sino que mencionar aquí, ya que tiene el potencial de ser una herramienta valiosa para las investigaciones de *Neospora caninum* infección y patogénesis de la neosporosis en la vida silvestre. En comparación con la PCR convencional y anidada, qPCR tiene mayor sensibilidad, no requiere mayor cantidad de material de partida, y permite la detección y la estimación cuantitativa de *Neospora caninum* en muestras biológicas. Varias técnicas diferentes qPCR dirigidos al gen Nc5 se describen (Collantes-Fernández *et al.*, 2002, Muller *et al.*, 2002; Okeoma *et al.*, 2005; Ghalmi *et al.*, 2008). A nuestro entender, qPCR no se ha utilizado en cualquier especie de vida silvestre. (Citado por Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, y Šlapeta N, 2015).

#### 2.4.6 Epidemiología

Diferentes estudios epidemiológicos evidencian que es más probable que aborten vacas seropositivas a Neospora que las seronegativas (Wouda *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Stenlund, 2000; Dubey, 2003; Moore *et al.*, 2005), siendo el riesgo de abortar 3 a 7 veces mayor en las vacas infectadas que en las no infectadas (Innes *et al.*, 2001; Williams *et al.*, 2003). Hay estudios que indican que una vaca que abortó previamente por Neospora tiene un menor riesgo de abortar en su siguiente gestación por esta causa, pero este dato es posible que esté influido por el grado de eliminación selectiva de las vacas que han abortado en un predio (Anderson *et al.*, 2000; Innes *et al.*, 2001). El aborto puede ser epidémico o endémico. Se considera un patrón de abortos endémicos cuando la tasa de abortos es mayor al 5% anual y que persiste por años (Anderson *et al.*, 2000) y los abortos son epidémicos cuando más del 10% de las vacas abortan dentro de 6 a 8 semanas. Aproximadamente el 5% de las vacas de un rebaño presentan abortos repetidos debidos a Neospora (Dubey, 2003). Mundialmente, las seroprevalencias reportadas en vacas de lechería están entre 12 y 42%, valores que varían según la región considerada y el tipo de prueba serológica usada (Dubey, 2003). En un estudio realizado en España se encontraron valores de 35,9% para vacas lecheras contra 17,9% en vacas de carne (Anderson *et al.*, 2000) mientras que en el Reino Unido la neosporosis representa el 12,5% de los abortos diagnosticados (Buxton *et al.*, 2002; McAllister y Latham, 2002; Pereira-Bueno *et al.*, 2003) comparado con el 15-20% reportado en los Países Bajos (McAllister y Latham, 2002). En el estado de Quebec, Canadá, se han observado seroprevalencias de 50 a 60% en vacas lecheras, mientras que en Alberta, las cifras reportadas son de 9 a 13,5% en vacas de carne (Wu *et al.*, 2002). Varios estudios epidemiológicos han encontrado asociación entre seroprevalencia de neospora y la presencia de perros en el predio, lo cual sugiere su rol de transmisión de la enfermedad (Paré *et al.*, 1998; Bartels *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000). Sin

embargo, a un falta determinar cuál es el papel que desempeña el perro en la epidemiología de la neosporosis bovina, cuál es el período de eliminación de ooquistes y por cuanto tiempo estos permanecen infectantes en el medio (Dijkstra *et al.*, 2001). También se ha descrito como potencial factor de riesgo la ingestión de alimentos contaminados con hongos, ya que la presencia de micotoxinas en bajas y repetidas dosis pueden provocar inmunosupresión, lo cual favorecería la reactivación de la enfermedad (Bartels *et al.*, 1999). El riesgo de aborto asociado a neospora también aumenta cuando existen infecciones concomitantes con otros patógenos, como diarrea viral bovina (McAllister y Latham, 2002). (Citado por Paz Valenzuela, 2005).

#### 2.4.7 Factores de riesgo

Actualmente se conocen distintos factores que incrementan el riesgo de infección por *Neospora caninum*, así como también existen factores asociados a la presencia de abortos. Como principales factores deben considerarse los siguientes.

##### **Factores de riesgo de infección**

Edad: Existen trabajos donde se ha demostrado que en rodeos endémicamente infectados con *Neospora caninum*, los valores de seroprevalencia no difieren en cuanto a la edad de los animales (Paré *et al.*, 1996). Sin embargo también existen trabajos realizados sobre rodeos bovinos infectados endémicamente, donde se ha observado un patrón en el título de anticuerpos en relación a la edad, existiendo valores significativamente más elevados en terneros precalostrales y calostrales comparados con el título promedio de grupos de otras edades. (Anderson *et al.*, 1995; Davison *et al.*, 1999; Pereira-Bueno *et al.*, 2000). Este evento es explicable por la existencia de una transmisión congénita reciente, junto con la reactivación de infecciones latentes durante la gestación y el paso de anticuerpos calostrales de la madre al ternero (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000). A su vez los terneros

y vaquillonas, de 7 a 12 meses de edad, presentan títulos inferiores a las categorías adultas (Pereira-Bueno *et al.*, 2000). A su vez se ha observado en esta última categoría que los títulos se incrementan a los 25 meses de edad, en aquellos animales que presentan infección congénita (Hietala; Thurmond, 1999), compatibles con estímulos antigénicos al comienzo de la etapa reproductora. Asimismo, otros autores también han descrito un incremento de la seroprevalencia con la edad (Jensen *et al.*, 1999). Estos hallazgos podrían explicarse gracias a la existencia de posibles factores fisiológicos o de manejo durante la gestación, capaces de producir reactivaciones de la infección crónica como ya fueron mencionados (Hietala; Thurmond, 1999; Quintanilla-Gozalo *et al.*, 2000). Sin embargo, también podría ser debido al contacto con el agente etiológico proveniente de una fuente exógena lo cual confirmaría la existencia de la transmisión horizontal. A su vez, el riesgo de que un animal sea seropositivo aumenta, aunque no en todos los casos, con la edad o número de gestaciones tanto en bovinos lecheros o de cría, sugiriendo que la transmisión horizontal tiene particular importancia en algunos rodeos (Dubey *et al.*, 2007). Por otro lado, considerando la transmisión vertical endógena, la proporción de terneros infectados congénitamente, disminuye al aumentar el número de partos de las hembras, registrando un 80%, 70%, 67% y 66% en vaquillonas, vacas de segunda parición, de tercera parición y mayores de tercera parición, respectivamente (Dubey *et al.*, 2006). Sistema de producción: la neosporosis bovina afecta tanto rodeos de cría como lecheros con mayor prevalencia en los últimos (Quintanilla-Gozalo *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Moore, *et al.*, 2002). Este podría estar relacionado con el tipo de manejo del ganado y no con una predisposición racial tal como se ha señalado (Thornton *et al.*, 1991; Paré *et al.*, 1998). El sistema de manejo en las explotaciones de leche normalmente es intensivo, mientras que en las de carne es más frecuente extensivo, por tanto el hacinamiento de los animales podría contribuir a una mayor exposición a posibles fuentes de contaminación

de ooquistes (alimento, cama, agua, cama, etc.) facilitando las posibilidades de contagio (Dijkstra *et al.*, 2002). Tamaño del rodeo: (Barling *et al.*, 2001). Demostraron que la seropositividad aumenta a medida que se incrementa la densidad animal. Esto podría deberse a un incremento en la probabilidad de la transmisión horizontal en los rodeos a partir de una fuente puntual de exposición a ooquistes infectantes, lo que probablemente explica, como se mencionó anteriormente, la mayor incidencia en rodeos para leche (Otranto *et al.*, 2003). Presencia de hospedadores definitivos e intermediarios: con algunas excepciones (Barling *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2003). Estudios previos han identificado a los perros, que se encuentran asociados a los rodeos, como un factor de riesgo de infección por *Neospora caninum* (Paré *et al.*, 1998; Mainar-Jaime *et al.*, 1999; Ould-Amrouche *et al.*, 1999; Schares *et al.*, 2003) y aborto relacionado a este agente (Bartels *et al.*, 1999). A su vez, existe una relación directa entre el tamaño del rodeo y la seroprevalencia asociado al número de caninos presentes en el establecimiento (Otranto *et al.*, 2003; Schares *et al.*, 2004). Se cree que en las grandes explotaciones existe un menor control sobre el consumo, por parte de los perros, de placentas, fetos abortados y otras fuentes de infección, interviniendo en la diseminación horizontal de la enfermedad (Bartels *et al.*, 1999; Otranto *et al.*, 2003; Corbellini *et al.*, 2006; Dubey *et al.*, 2007). Además, existe asociación positiva entre la abundancia de cánidos silvestres y la seropositividad de los bovinos. Se ha observado una relación entre la seroprevalencia en el ganado bovino y la abundancia de zorros y coyotes (Barling *et al.*, 2000). Sin embargo, también se ha sugerido que la presencia de perros disminuye la presencia de posibles hospedadores silvestres como el zorro, disminuyendo la seroprevalencia en bovinos (Barling *et al.*, 2001; Dubey *et al.*, 2007). A su vez la presencia de otros hospedadores intermediarios también sería un factor de riesgo. Un estudio (Dubey *et al.*, 2007) demostró la presencia de ADN de *Neospora caninum* en ratas y ratones infectados naturalmente sugiriendo que estos animales

podrían ser una importante fuente de infección para carnívoros. Se ha descrito una mayor seroprevalencia en perros de granja frente a los de zonas urbanas y una asociación significativa entre la presencia de perros en las granjas y el porcentaje de vacas seropositivas (Bartels *et al.*, 1999; Wouda *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 2003). A su vez, se han encontrado seroprevalencias mayores en aquellas explotaciones bovinas más próximas a zonas urbanizadas, lo cual es explicable por un mayor densidad de la población canina (Schaes *et al.*, 2003). Reposición de vientres: en los rodeos seronegativos existe un mayor riesgo de infección cuando se utilizan para reposición vaquillonas de compra (Schaes *et al.*, 2004). Mientras que si la enfermedad es endémica en un establecimiento, la reposición con vientres propios conlleva al mantenimiento de la infección (Barling *et al.*, 2001; Otranto *et al.*, 2003; Dubey *et al.*, 2007). Clima: las condiciones climáticas tienen efecto sobre la esporulación de los ooquistes y sobrevida del parásito en el medio ambiente. Temperaturas cálidas y alta humedad incrementan el riesgo de infección posnatal (Bartels *et al.*, 1999). A su vez estas condiciones hacen propenso al crecimiento de hongos y producción de micotoxinas que tras su consumo tienen un efecto inmunosupresor sobre los bovinos, posiblemente favoreciendo la reactivación del parásito (Bartels *et al.*, 1999). Manejo nutricional: las diferentes prácticas de manejo nutricional, como el traslado de los rodeos fuera del establecimiento, de forma permanente o temporaria, en busca de recursos forrajeros, fue asociado con incremento en la seroprevalencia. Por otro lado, el uso de suplementos nutricionales o cercos para rollos podría incrementar la población de hospedadores intermediarios, como roedores, constituyendo una posible fuente de infección para los hospedadores definitivos (Dubey *et al.*, 2007). Raza: las diferencias de prevalencia entre razas en estudios realizados en Europa, no sería por variaciones en susceptibilidad, sino por los diferentes sistemas de producción e intensidad en los manejos a los que están sujetos cada una (Bartels *et al.*, 2006). Diferentes estudios han demostrado que la raza

Limusín posee una menor prevalencia a la infección por *Neospora caninum* (Hornok *et al.*, 2006; Armengol *et al.*, 2007) y una menor tasa de abortos ha sido observada cuando se realizaron cruzamientos con Limousin (García-Ispuerto *et al.*, 2005). En estudios previos (López-Gatius *et al.*, 2005), se demostró que el uso de semen de toros para carne reduce el riesgo de aborto en vacas lecheras seropositivas a *Neospora caninum*. Estos resultados refuerzan la idea de que existen diferencias entre razas de ganado de carne en cuanto a su susceptibilidad a la infección el aborto por *Neospora caninum*.

### **Factores de riesgo asociados al aborto**

Presencia de infección: las hembras seropositivas tienen mayor riesgo de abortar que aquellas seronegativas. Diferentes estudios han descrito una asociación significativa entre la presencia de la infección y el aborto, con un riesgo 2 a 3,5 veces superior en las vacas seropositivas que en las seronegativas (Paré *et al.*, 1997; Wouda *et al.*, 1998; Davison *et al.*, 1999; Stenlund *et al.*, 1999). No obstante, el riesgo de aborto parece disminuir en las gestaciones siguientes a dicho acontecimiento y solo el 4 a 5% de los animales abortan en más de una ocasión (Dubey; Lindsay. 1996; Anderson *et al.*, 1995). Produciéndose en la mayoría de los casos el nacimiento de terneros congénitamente infectados. Asimismo, un animal que tiene títulos de anticuerpos elevados posee mayor riesgo de aborto. Una alta seroprevalencia está asociada con un riesgo más elevado de abortos a nivel del rodeo (Dubey *et al.*, 2007). (Hobson *et al.*, 2005), reportaron que por cada 1% que se incrementaba la seroprevalencia de *Neospora caninum* en el rodeo, el riesgo de que se experimentara un aborto relacionado a este parásito se incrementaba un 6%. Presencia de hospedadores definitivos: existe una asociación positiva entre la presencia de perros y abortos epizooticos asociados a *Neospora caninum*, debido posiblemente a que éstos serían ocasionados por transmisión horizontal (Bartels *et al.*, 1999; Hobson *et al.*, 2005; Dubey *et al.*, 2007). La presentación epidémica de aborto por

neosporosis se ha asociado con una posible exposición a los ooquistes del parásito (McAllister *et al.*, 2000; Dijkstra *et al.*, 2002). En aquellas explotaciones con evidencia de transmisión postnatal fue más frecuente la observación de defecaciones caninas en zonas de almacenamiento de comida, así como también el consumo de placentas, fetos abortados o calostro por parte de los perros (Dijkstra *et al.*, 2002). Abortos previos: se ha observado que vacas infectadas congénitamente que habían abortado con anterioridad, tuvieron mayor riesgo de abortar que vacas infectadas congénitamente que no habían experimentado un aborto antes (Thurmond; Hietala, 1997). Otras infecciones concomitantes: algunos autores sugieren que la infección por el virus de la diarrea viral bovina (DVB) favorece la manifestación clínica de la neosporosis bovina por la inmunosupresión que ocasiona en el animal facilitando la reactivación de las infecciones latentes o la infección postnatal (Dubey *et al.*, 2007).

Edad: las diferencias encontradas en relación con el riesgo de aborto de los animales y la edad han sido poco sólidas o no son significativas, señalando que la infección se ha diagnosticado en fetos abortados por vacas de edad muy variable (Dubey; Lindsay, 1996). No obstante, el modo de transmisión del parásito también puede influir en el riesgo de aborto en relación con la edad. En casos de abortos epidémicos asociados con la transmisión horizontal no se han observado diferencias significativas entre las tasas de aborto obtenidas en los diferentes grupos de edad de los animales abortados. Aun así, parece que las vacas congénitamente infectadas tienen más probabilidad de abortar en su primera gestación (Thurmond; Hietala, 1997). En otros estudios, también se ha observado que la proporción de infecciones congénitas disminuía según aumentaba el número de partos, posiblemente debido al desarrollo de inmunidad protectora (Thurmond; Hietala, 1997; Wouda *et al.*, 1998; Dijkstra *et al.*, 2003).

#### 2.4.8 El control de la neosporosis bovina silvestre.

El control de la neosporosis bovina debe concentrarse principalmente en identificar a los animales positivos, reducir el número de prevalencia e impedir los nuevos animales se infecten, a través de acciones dirigidas a interrumpir las principales vías de transmisión (Álvarez-García, 2003). Se recomienda la incorporación de los animales seronegativos en el rebaño la selección y disposición hembras positivas es un método eficaz de control de (Dubey y Lindsay, 2006).

- Para el control del medio ambiente se recomienda atención a las fuentes ambientales transmisión horizontal.
- Evitar la exposición y el contacto de cánidos con placentas fetos abortados sigue siendo de prioridad
- Mantener las fuentes de alimentos y agua libre de acceso a Perros, ellos defecan en estos lugares (Dubey y Lindsay, 2006).
- La supervivencia del parásito, a través de su mantenimiento en un ciclo de vida en el entorno salvaje, amplía las posibilidades de infección el ganado doméstico. Este hecho hace que sea aún más difícil de implementar medidas el cual tiene como objetivo controlar la neosporosis, puesto que las acciones preventivas recomendadas no se aplicará a los animales salvajes (Gondim et al., 2004b; y Rosypal Lindsay, 2005; Gondim, 2006). Sin embargo, en la medida de lo posible, se deben priorizar las acciones que siempre se centran en la interrupción de las vías de transmisión *Neospora caninum*, manteniendo especial atención a las fuentes de alimentación y agua de animales domésticos.
- Además de la preocupación por los cánidos y rumiantes silvestres, se debe tomar atención, de controlar los roedores y aves silvestres, que son reservorios y fuentes potenciales de infección a los carnívoros domésticos. (Citado por Sales Guimarães M, 2011).

#### 2.4.9 Vacunación

En los EE.UU. y México se otorgó una licencia para la utilización de una vacuna elaborada con taquizoitos lisados (inactivados) que se consideró segura en vacas preñadas sanas, y aunque se demostró que al aplicarla se reducía la tasa de abortos debido al aumento en la producción de anticuerpos anti *Neospora caninum*, no evitaba la infección de los fetos, por lo que ya no está disponible en el mercado (Choromanski *et al.*, 2000). Recientemente se han elaborado y se están investigando vacunas preparadas con taquizoitos vivos atenuados, antígenos parasitarios completos o fracciones de ellos y antígenos recombinantes que experimentalmente parecen ser prometedores y más eficaces al estimular la inmunidad celular en contra del parásito; sin embargo, aún no están disponibles en el mercado (Monney y Hemphill, 2014). (Citado por Albetair, 2015).

#### 2.4.10 Tratamiento

Se han estudiado varios antimicrobianos in vitro o in vivo en ratones; sin embargo, por el momento no existe un fármaco conocido que pueda utilizarse frente a la infección por *Neospora caninum* en el ganado. Además, el posible desarrollo a la resistencia del fármaco y las demandas del consumo de carne y productos lácteos libres de químicos pueden limitar a la quimioterapia como medida de control (Reichel *et al.*, 2014). (Citado por Morales Salinas E., 2014).

#### 2.4.11 Impacto económico de la infección por *Neospora caninum*

La principal pérdida económica ocasionada por la neosporosis se debe a los problemas reproductivos, incluyendo pérdidas directas como abortos, natimortos, muertes perinatales, incremento del intervalo parto concepción. Entre las pérdidas indirectas se incluye la asistencia profesional, gastos asociados a establecer el diagnóstico, además de los costos de reposición si las vacas abortadas son eliminadas (Dubey *et*

*et al.*, 2007). Asimismo, existen evidencias de disminución en la producción de leche y carne, aunque existe información contradictoria al respecto (Hernández *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2005). Barling *et al.*, (2000) detectaron menor ganancia de peso pos destete, menor peso de la res y menor retorno económico asociado con la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* en terneros de engorde a corral. No existen datos concluyentes acerca de las pérdidas económicas debidas a la neosporosis bovina pero la importancia de este proceso en la industria ganadera está fuera de toda duda. En California y Holanda, el 20% de los abortos bovinos son causados por *Neospora caninum*; en Bélgica y Reino Unido alrededor del 12,5% (Davison *et al.*, 1999; De Meerschman *et al.*, (2002); y en España las tasas de participación están entre el 10,7 y el 57%, en dependencia de la técnica diagnóstica utilizada (González *et al.*, 1999; Pereira-Bueno *et al.*, 2003). En California se calculan pérdidas de 35 millones de dólares al año (Dubey, 1999); en Nueva Zelanda y en Australia, donde la infección es responsable de aproximadamente el 25% de los abortos diagnosticados, se considera la causa más importante de pérdidas económicas, con un gasto de 100 millones de dólares australianos anuales (Reichel, 2013). En Canadá se estima que en una explotación de 50 animales, las pérdidas pueden llegar a ser de 2305 dólares canadienses por año (Chi *et al.*, 2002). Por otra parte, también se deben considerar los costos indirectos asociados al aborto tales como infertilidad, repetición de celo, asistencia veterinaria, gastos de diagnóstico, reposición, posibles pérdidas de producción de leche y compra de ganado en caso de sacrificio. Las pérdidas postnatales debidas a la neosporosis son difíciles de valorar, puesto que en los animales adultos, excluyendo el aborto, la infección es asintomática (Thurmond; Hietala 1997). (Citado por Rodríguez Alejandro M; 2015).

### 3. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.

#### 3.1 Antecedentes Internacionales

##### 3.1.1 Garashi M, Okada T, Salman D, Oohashi E, Elsayed A, Mottelib A.

Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en conejos en Japón. La posible contaminación de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* con ooquistes en el medio humano es una preocupación desde el punto de vista de la salud pública. Sin embargo, la estimación de su seroprevalencia en los seres humanos no se puede realizar de una manera que distingue entre los ooquistes y quistes tisulares como una fuente de infección. Los conejos son considerados animales de compañía populares en Japón que pueden adquirir infecciones naturales por parte de los parásitos antes mencionados sólo a través de la ingestión de ooquistes. Por lo tanto, este estudio se realizó para estimar la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en conejos en Japón como un indicador de la posible contaminación de ooquistes en el medio ambiente que rodea los seres humanos. Las muestras de suero de 337 conejos fueron examinados por diferentes métodos serológicos. Se llevaron a cabo ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas para medir el título de los anticuerpos IgG e IgM. Las muestras reveladas de ser seropositivos por ELISA fueron analizadas mediante un ensayo de aglutinación de látex, Western Blot y un ensayo de inmuno fluorescencia indirecta. Las tasas de seropositividad para *Toxoplasma gondii* fueron 0,89% (3/337) y 0,29% (1/337) de IgG e IgM ELISA, respectivamente. SAG1 y SAG2 se detectaron como principales antígenos por los sueros de conejo positivo en la transferencia Western asociada con una fuerte tinción observado por IFA en taquizoitos de *Toxoplasma gondii*. En cuanto a *Neospora caninum*, ninguna de las muestras de suero mostró una reacción específica, tanto en la transferencia Western y el IFA. Los resultados de este estudio indican baja seroprevalencia de toxoplasmosis y

neosporosis en conejos en Japón, lo que sugiere la contaminación baja de ooquistes en el entorno humano.

Garashi M, Okada T, Salman D, Oohashi E, Elsayed A Mottelib. (2014) Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en conejos en Japón, J Vet Med Sci Jun; 76 (6): 855-862. Publicado en Internet el 2014 Mar 3. doi: 10.1292 / jvms.13-0632 PMID: PMC4108769

**3.1.2 Bártová E, Sedlák K, Tremel F, Holko I, Literák I.** Anticuerpos a *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* en liebres europeas de la República Checa, Eslovaquia y Austria. En liebres europeas (*Lepus europaeus*) procedentes de la República Checa, Eslovaquia y Austria; se realizaron pruebas de anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* mediante un ensayo inmunoenzimático inhibición competitiva y de anticuerpos séricos contra *Toxoplasma gondii* mediante una prueba de inmuno fluorescencia indirecta. Un total de 925 muestras fueron analizadas, 280 (30%) y 132 (14%) reaccionaron positivamente a *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*, respectivamente. De 333 liebres procedentes de la República Checa, 129 (39%) y 71 (21%) reaccionaron positivamente a *Neospora caninum* y anticuerpos de *Toxoplasma gondii*. De 209 liebres de procedentes de Eslovaquia, 8 (4%) y 13 (6%) reaccionaron positivamente a *Neospora caninum* y anticuerpos de *Toxoplasma gondii*. 383 liebres procedentes de Austria, 143 (37%) y 48 (13%) reaccionaron positivamente a *Neospora caninum* y a los anticuerpos de *Toxoplasma gondii*, respectivamente. Se detectó una infección mixta (presencia simultánea de ambos anticuerpos *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii*), En 25 (8%), liebres de la República Checa, en 14 liebres (4%) de Austria y en ninguna liebre de Eslovaquia. Es el primer informe de anticuerpos contra *Neospora caninum* en liebres en la República Checa y Austria.

**Fuente:** Bártová E , Sedlák K , Tremel F , Holko I , Literák. 2010 *Neospora caninum* y *Toxoplasma gondii* anticuerpos en liebres europeas en la República Checa, Eslovaquia y Austria. I. Lugar Fecha:

Eslovaquia y Austria 2010. Información del autor<sup>1</sup> Universidad de Veterinaria y Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Veterinaria de Higiene y Ecología, Departamento de Biología y vida silvestre Enfermedades, Palackého 1/3, 612 42 Brno, República Checa. bartovae@vfu.cz Copyright (C) 2010 Elsevier BV Todos los derechos reservados Vet Parasitol 2010 Jul 15; 171 (1-2): 155-8.

**3.1.3 Valeria Natalia Baldone, Lumila Ivana Fuchs<sup>1</sup>, María del Carmen Rojas, Marcelo Cristian Fort, Cecilia Venturini, Hugo Daniel Giménez<sup>4</sup>** Neosporosis y toxoplasmosis en la liebre europea (*Lepus europaeus*) en la provincia de La Pampa (Argentina). Se muestrearon 106 liebres, de las cuales 46 se obtuvieron en acopiadores de la localidad de Anguil, 29 de Uriburu, 10 de Lonquimay, 8 de Ataliva Roca, 7 de Catrilo y 6 de Santa Rosa. A todas las liebres muestreadas se les determinó el sexo, obteniendo 66 hembras y 40 machos. Se encontró una diferencia significativa entre el número de hembras y machos. Se registró el peso de 98 liebres, en las restantes no fue posible debido a que en ciertas ocasiones no se contaba con los elementos necesarios para hacerlo. La media de los pesos fue de 3.91 Kg. La prueba de ELISA-c para neosporosis se realizó en 44 sueros, 39 de los cuales dieron resultados negativos y 5 positivos. La media de las densidades ópticas (DO) expresadas en porcentaje de los resultados positivos fue 42.8. Para toxoplasmosis se aplicó HAI a los 106 sueros, todos dieron resultados negativos.

**Fuente:** Valeria Natalia Baldone, Lumila Ivana Fuchs, María del Carmen Rojas<sup>1</sup>, Marcelo Cristian Fort, Cecilia Venturini, Hugo Daniel Giménez (2004). Neosporosis y toxoplasmosis en la liebre europea (*Lepus europaeus*) en la provincia de La Pampa (Argentina), La Pampa, Argentina.

**3.1.4 Ezio F, Anna T.** Los anticuerpos a *Neospora caninum* en la liebre europea marrón (*Lepus europaeus*). *Neospora caninum* en liebres europeas (*Lepus europaeus*), fueron reportados por primera vez

en los sueros obtenidos de liebres europeas, en Italia de Europa del este. Los sueros de 93 liebres procedentes de Hungría y 44 liebres procedentes de Eslovaquia se pusieron a prueba mediante una prueba de aglutinación directa (DAT). La seroprevalencia fue 8,0% a la dilución 1:40 y 1,5% a la dilución 1: 320. La seroprevalencia en hembras y machos no difirió significativamente. los resultados indican que las liebres europeas marrones están expuestas a *Neospora caninum*. La baja prevalencia observada sugiere una mínima exposición, pero teniendo en cuenta que las liebres son presa común de los zorros, se podría suponer que, también con una baja prevalencia, las liebres pueden ser una fuente importante de infección de *Neospora caninum*.

**Fuente:** Ezio F, Anna T 2003 . Los anticuerpos a *Neospora caninum* en la liebre europea marron (*Lepus europaeus*). *Vet Parasitol* 2003 Jul 10; 115 (1): 75-8. Información del autor1 Departamento di Produzioni Animali, Epidemiología de Ecología, Universidad de Turín, Vía L. Da Vinci 44, 10095 Grugliasco (Turín), Italia. ferroglio@veter.unito.it.

### 3.2 Antecedentes en el Perú.

#### 3.2.1 Neosporosis Bovina

**Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA. Programa de Desarrollo de la Sanidad Agraria e Inocuidad Agroalimentaria – PRODESA.** Proyecto: Fortalecimiento del Sistema de Vigilancia Zoonosario Informe Final: Caracterización de la Diarrea Viral Bovina, Neosporosis Bovina y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Perú. dic. 2010. En estudios anteriores realizados en el Perú, para detectar NB en las principales cuencas lecheras, solo se muestrearon explotaciones lecheras de tipo intensivo y se encontraron prevalencias altas en Arequipa 57% (Andresen, 1999), Cajamarca 40% (Cabrera *et al.*, 2000) y Lima 29.6% (Silva *et al.*, 2002); sin embargo existe otros estudios

realizados en zonas más limitadas como: en la provincia de Melgar (Puno) se encontró una prevalencia de 18.1% (Atoccsa *et al.*, 2005), y en los distritos de Leymebamba y Molinopampa (Amazonas) se halló una prevalencia de 40.4% (Quevedo *et al.*, 2003). A diferencia, en este estudio hemos encontrado para dichos departamentos las siguientes prevalencias: Arequipa 48.91%  $\pm$  7.22, Cajamarca 19.59%  $\pm$  3.20, Lima 50.51%  $\pm$  6.96, Puno 6.68%  $\pm$  2.27, Amazonas 17.22%  $\pm$  5.52. Para algunos casos, no hay diferencias marcadas entre las prevalencias pero en otros sí, las cuales presumiblemente se pueden deber al tipo de prueba utilizada (inmunofluorescencia indirecta-IFI, en estudios anteriores, y ELISA en el presente estudio). Las prevalencias prediales, obtenidas en el presente estudio, llegaron al 100% en los departamentos de Arequipa, Ica, Moquegua y Tacna, lo que indica que todas las UPMs muestreadas en dichos departamentos tuvieron por lo menos un animal positivo a NB, en tanto que en el resto de departamentos esta prevalencia fue mayor del 20%. No fue posible comparar los datos obtenidos en el presente estudio con estudios realizados anteriormente en el país, debido a que no los calcularon; sin embargo en un estudio realizado en la IX Región de Chile, se reporta prevalencias prediales para *Neospora caninum*, en vacas lecheras con antecedentes de abortos, entre 15,7 a 30,2% (Patitucci *et al.*, 2000), la que son más bajas que del presente estudio, lo que se puede deber a que ellos usaron la prueba de IFI, que tiene una sensibilidad y especificidad inferior a la obtenidas con la ELISA (Paré *et al.*, 1997). Los resultados encontrados nos muestran que la NB está ampliamente distribuida a nivel nacional, lo que se ha reflejado en el número de UPMs (274/409; 66.99%  $\pm$  4.56) y animales (931/4580, 20.33%  $\pm$  1.17) positivos encontrados con la prueba de ELISA en todo el Perú.

**Fuente:** Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA. Programa de Desarrollo de la Sanidad Agraria e Inocuidad Agroalimentaria – PRODESA. Proyecto: Fortalecimiento del Sistema de Vigilancia Zoonosario Informe Final: Caracterización de la Diarrea Viral Bovina,

Neosporosis Bovina y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Perú. Dic. 2010.

### 3.2.2 Neospora bovina, estudios de neospora en Tacna.

A. **Flores Aybar, H.** Perú, 2015. 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. Para el presente estudio se ha utilizado dos pruebas serológicas la prueba de Inmunoflorecencia indirecta y la prueba de ensayo Inmunoenzimático ligada a enzimas indirectas. Para el análisis estadístico se empleó SPSS versión 21. La seroprevalencia de *Neospora caninum*, del ganado vacuno de la raza Holstein de la cuenca lechera de Tacna de 179 animales muestreados, 49 resultaron positivos 27.37% a la prueba de (IFI) y 44 resultaron positivos a ELISA representando el 24.58%, la neosporosis por categoría en vaquillas y vaquillonas 14 resultaron positivas y 59 en vacas (IFI), a la Prueba de ELISA dieron positivo 80 vacas 14 vaquillas y vaquillonas.

**Fuente:** Hugo Flores Aybar, 2015. 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

B. **Alarico Zeballos, D.A.** Perú, 2012. Determinación de seroprevalencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en bovinos de leche del distrito de Locumba-Tacna 2012. El *Neospora caninum*, parásito del canino, es ampliamente conocido como causante de abortos y mortalidad neonatal en bovinos a nivel mundial. El objetivo del presente estudio fue determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de leche del distrito de Locumba de

la provincia de Jorge Basadre Grohmann región Tacna. Se evaluaron 195 sueros de bovinos de leche. El método utilizado fue la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los resultados obtenidos en nuestro estudio son: la seroprevalencia positiva de anticuerpos a *Neospora caninum* es de 44,10%, en cuanto a la edad se evidenció una seroprevalencia positiva mayor en los 5 a 6 años con un 11,28% y la presencia de abortos con un 23,07% estos valores sometidos a la prueba estadística nos indica que no son factores determinantes que influyan en la presentación de la enfermedad. Por otro lado, la procedencia que evidenció valores de seroprevalencia positiva del 32,31% para Locumba. En cuanto a la etapa en que se produjo el aborto se demostró una mayor seroprevalencia positiva en el segundo tercio de gestación con 39,29%, con respecto al destino de feto y placentas presentó un mayor porcentaje cuando se entierra o echa a la basura los restos con 23,08%, y por último en cuanto a la presencia de perros y cánidos salvajes se obtuvo una seroprevalencia de 41,03% y 23,08% respectivamente, estos valores sometidos a la prueba estadística nos indica que son factores determinantes que influyen en la presentación de la enfermedad. Estos resultados demuestran la existencia de una seroprevalencia elevada de bovinos infectados con *Neospora caninum* en la región estudiada.

**Fuente:** Alarico Zeballos, Daniel Alberto (2012) Determinación de seroprevalencia de anticuerpos a *Neospora caninum* en bovinos de leche del distrito de Locumba-Tacna-Perú 2012.

- C. **Ticona Choque, J.L.** Perú, 2011. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos Lecheros del Distrito de Ite – Tacna, El presente Trabajo de investigación se realizó para determinar la prevalencia de *Nospora caninum* en bovinos lecheros en el distrito de Ite provincia de Jorge Basadre Tacna, se obtuvieron 241 muestras de bovinos lecheros, A través de una prueba de

Inmunofluorescencia, indirecta, se determinó la seroprevalencia de *Neospora caninum* con una prevalencia de 44.39%.

**Fuente:** José Luis Ticona Choque (2011) Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos Lecheros del Distrito de Ite – Tacna,

D. **Vélez, V., Cahuana, J. Pérez, O.** Perú, 2006. Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos Lecheros en el sector Sama Grande del Distrito de Sama-Inclán, Tacna - Perú. Se diseñó un estudio para determinar la seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros en el sector de Sama Grande del Distrito de Sama-Inclán, en la Provincia y Departamento de Tacna. Se obtuvieron 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 una prueba de inmuno fluorescencia se determinó la seroprevalencia a *Neospora caninum*, la cual resultó ser moderada y con un valor de  $28,70 \pm 8,27$ ; considerando la edad de los animales se observó que los animales de < 7 a 10 años presentaron los valores más elevados de seroprevalencia ( $44,44 \pm 32,46$ ), luego los animales de 2 a 4,5 años ( $27,87 \pm 11,25$ ), y finalmente los animales de < 4,5 a 7 años ( $26,67 \pm 12,92$ ), respectivamente. De otro lado, la seroprevalencia del parásito considerando el lugar de procedencia fue de  $30,00 \pm 16,40$  para animales procedentes de Arequipa,  $50,00 \pm 40,01$  para Ite,  $30,00 \pm 10,74$ , para Sama, y ausente para la Yarada, respectivamente. Analizando La edad y la procedencia de los animales como posibles factores de riesgo, estos no resultaron estadísticamente significativos. Asimismo, es probable que otros factores de riesgo condicionarían la presencia del parásito en la zona de estudio.

**Fuente:** Víctor Vélez, Juel Cahuana, Oscar Pérez (2006) Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Bovinos Lecheros en el sector Sama Grande del Distrito de Sama-Inclán, Tacna – Perú.

### 3.2.3 Neospora en perros.

**A. Vega, O.L., Chávez, V.A., Falcón, P. N., Casas, A.E., Puray, Ch.N.** Prevalencia de *Neospora caninum* en perros pastores de una empresa ganadera de la sierra sur del Perú. La neosporosis es una parasitosis que afecta a una gama de mamíferos domésticos y silvestres; destacando, por su importancia, la especie bovina, al producir problemas reproductivos como el aborto; y la especie canina, al actuar como hospedador definitivo y como fuente de diseminación de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia de *Neospora caninum* en perros pastores procedentes de cinco zonas de producción de la empresa Rural Alianza ubicada en el departamento de Puno. Se evaluaron 122 muestras de suero canino, recolectadas en los meses de febrero y marzo de 2004 y evaluadas mediante la prueba de Inmuno fluorescencia Indirecta (IFI), en una dilución de 1:50. Se encontró una prevalencia de  $14.8 \pm 6.3\%$  (18/122). No se encontró diferencia estadística entre las variables procedencia (cinco sectores de la empresa), sexo y edad (<1, 1 a 7, >7 años), mediante la prueba de Chi Cuadrado. Este estudio demostró que los perros de la empresa Rural Alianza tuvieron contacto con *Neospora caninum*. Además, al comparar los valores hallados con estudios paralelos realizados en camélidos sudamericanos y bovinos de Puno, se evidenció una similitud en los valores de prevalencia entre los hospedadores intermediarios y definitivo.

**Fuente:** Luis Vega O., Amanda Chávez V., Néstor Falcón P., Eva Casas A., Nidia Puray Ch. 2010. Prevalencia De *Neospora caninum* en perros pastores de una empresa ganadera de la sierra sur del Perú, Junín.

**B. Del Campo S., Chávez V.A., Delgado C.A., Falcón P.A., Ornelas A.A., Casas A.E. y Serrano M.E.** Perú, 2003. Frecuencia de *Neospora Caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima.

La neosporosis es una enfermedad parasitaria ocasionada por el *Neospora caninum*, que cursa con problemas reproductivos en el ganado lechero; y, signos nerviosos en el perro, el cual es un hospedero definitivo. El objetivo del estudio fue determinar la frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima. Se evaluaron 104 muestras de suero de caninos mayores a 3 meses de edad, provenientes de 23 establos lecheros, mediante la detección de anticuerpos contra *Neospora caninum* a través de la prueba de inmuno fluorescencia indirecta. El  $32.7 \pm 9.0\%$  (34/104) de las muestras fueron positivas a *Neospora caninum* en una dilución de 1:50, siendo las provincias del Huaura y Huaral las que tuvieron los mayores niveles de seropositividad (58.8%, 10/17). No se hallaron diferencias estadísticas significativas en las variables edad y sexo.

**Fuente:** Jorge Del Campo S; Amanda Chávez V; Alfredo Delgado C; Néstor Falcón P; Ángela Ornelas A; Eva Casas A. y Enrique Serrano M (2003) Frecuencia de *Neospora Caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima 1 Facultad de Veterinaria y Zootecnia, Universidad Peruana Cayetano

### 3.2.4 *Neospora* en Camélidos Sud Americanos

- A. Casas V.G., Chávez V.A., Casas A.E., Leyva V.L., Alvarado S.A., Serrano M.E., Ticona S.D. y Puray Ch. N.** Perú, 2004. Presencia de *Neospora caninum* en llamas de una empresa ganadera de la Sierra Central Neospora Camélidos Sud Americanos. El *Neospora caninum* es un protozoo implicado como agente causal de abortos y muerte neonatal, principalmente en el ganado bovino. El presente estudio se llevó a cabo para determinar la seroprevalencia a *Neospora caninum* en llamas de la zona central del país. Se evaluaron 175 sueros de llamas hembras en edad reproductiva, pertenecientes a la empresa Sociedad Agraria de Interés Social (SAIS) Pachacútec, del departamento de Junín, mediante la técnica

de inmuno fluorescencia indirecta (IFI). Los resultados confirman la presencia *del Neospora caninum* en llamas de la sierra central, aunque con una seroprevalencia reducida ( $2.9 \pm 2.5\%$ ).

**Fuente:** Gina Casas V.; Amanda Chávez V.; Eva Casas A.; Víctor Leyva V.; Arnaldo Alvarado S.; Enrique Serrano M.; Daniel Ticona S. y Nidia Puray Ch. (2004) Presencia de *Neospora caninum* en llamas de una empresa ganadera de la Sierra Central.

#### 4. OBJETIVOS

- Evaluar si el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas tiene relación con el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en vacunos.
- Determinar el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas de Ite.
- Determinar el nivel de anticuerpos a *Neospora caninum* en vacunos de Ite.

#### II. HIPÓTESIS

Dado que el ecosistema donde viven las liebres europeas y vacunos del distrito de Ite están superpuestos.

Es probable que encontremos niveles de anticuerpos a *Neospora caninum* en liebres europeas, que se relacionen con los niveles de seroprevalencia a *Neospora* encontrados en vacunos.

## I. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

### 1. TÉCNICAS INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN.

#### 1.1 Técnica.

Observación de laboratorio mediante la técnica de Elisa.

#### **Metodología de muestreo disposición de especímenes.**

Con un vehículo por la noche se realizará un reconocimiento de las zonas de caza del distrito de Ite, de acuerdo a la cantidad de liebres observadas, se realizará la discriminación de zonas, Para cazar las liebres europeas se utilizara un arma de aire comprimido a pistón, seguidamente se colectarán las muestras de sangre; se registraran en una libreta los datos más resaltantes, como la ubicación, cercanía a establos, parcela de pastoreo, presencia de canes, presencia de vacunos, los especímenes cazados serán trasladados a una poza séptica, donde se les roseara cal viva, posteriormente serán enterrados.

#### **El procedimiento de laboratorio consiste en:**

##### **Obtención de muestras:**

Se extraerá sangre procedente de la vena yugular de las liebres europeas, y en vacunos de la vena coccígea, se utilizara un vacutainer para la recolección de muestras procediendo a su identificación y posterior ubicación en una caja de tecnoport que contiene hielo para su conservación hasta el momento de su centrifugación, por un tiempo de 15 min a 2500 rpm. Los sueros sanguíneos se trasvasarán a un vial con tapa rosca hermética, que se conservarán a -20 °C en una cámara de frio, completadas las muestras serán trasportadas al laboratorio para su procesamiento.

##### **Determinación de anticuerpos:**

La determinación de anticuerpos a *Neospora caninum* se realizará mediante el ensayo inmunoenzimático de competición (ELISA-c) cuya denominación

comercial es; *N. caninum* Antibody Test Kit ELISA c (VMRD®, Inc.), cual utiliza un nivel de corte del 30%, se aplicara el cálculo del porcentaje de inhibición, a los valores del control negativo, de las densidades ópticas obtenidas, por cada muestra, de acuerdo a la fórmula del Kit ELISA VMRD. Se considerara una muestra positiva a *Neospora caninum* cuando el porcentaje de la densidad óptica (DO) obtenida es  $\geq 30\%$  y negativa si es  $< 30\%$ .

### Equipos de laboratorio y materiales

- Centrifuga.
- Refrigeradora
- Gasa /algodón
- Alcohol
- Bolsas plásticas
- Tarritos con tapa rosca PFA x 20ml.
- Kit prueba Elisa (*Neospora caninum*).
- Lectora de Elisa
- Micropipetas 8 canales.
- Guantes quirúrgicos.
- Tubos vacutainer tapa amarilla
- Capuchón de vacutainer
- Gradilla
- Caja de tecnoport
- Lápiz marcador
- Bolsas platicas

### Diseño Estadístico:

Distribución de frecuencias absolutas, relativas y porcentuales, medidas de tendencia central y dispersión.

## Análisis Estadístico

Se aplicara la prueba del coeficiente de correlación de Pearson. Para establecer el grado de asociación entre las dos especies.

### Formula

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{N}}{\sqrt{\left(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}\right) \left(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N}\right)}}$$

### Dónde:

$r$  = coeficiente de correlación de Pearson.

$\sum xy$  = sumatoria de los productos de ambas variables.

$\sum x$  = sumatoria de los valores de la variable independiente.

$\sum y$  = sumatoria de los valores de la variable dependiente.

$\sum x^2$  = sumatoria de los valores al cuadrado de la variable independiente.

$\sum y^2$  = sumatoria de los valores al cuadrado de la variable dependiente.

$N$  = tamaño de la muestra en función de parejas

## 2. CAMPO DE VERIFICACIÓN.

### 2.1 Ubicación espacial.

La presente investigación se realizará en La Provincia Jorge Basadre, Distrito de Ite, departamento de Tacna.

### Ite:

El distrito de se sitúa, entre las coordenadas  $17^{\circ} 50' 27''$ , Latitud Sur y los  $70^{\circ} 57' 47''$  de Longitud Oeste. Durante la mayor parte del año, el clima es cálido y con escasa precipitación en la zona; la temperatura media registrada es de  $19^{\circ}\text{C}$ , con valores máximos de  $32^{\circ}\text{C}$ , para los meses de enero y febrero.

La humedad relativa media es de 72%, con valores máximos de 89% para los meses de setiembre y octubre; con un mínimo de 60% para el mes de febrero. (Información catastral 2009).

## **2.2 Ubicación temporal**

El presente trabajo de investigación se realizará en los meses de setiembre a diciembre 2016.

## **2.3 Unidades de estudio.**

El universo, de Liebres silvestres *Lepus europaeus* y vacunos procedentes de los distrito de Ite.

### **Muestra.**

Se trabajará con 12 liebres europeas y 12 vacunos, procedentes de Ite.

### **Procedimiento del muestreo.**

Se realizará un muestreo estadístico al azar por conglomerado.

## **3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.**

### **3.1 Organización:**

Se solicitará un permiso de caza de liebres europeas, (*Lepus aeuropaesus*) procedentes del distrito de Ite, al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) de la ciudad de Tacna, se realizaran seguimientos por las noches a las liebres europeas, buscando identificar con los caminos que recorre, espacios de alimentación, así determinar las potenciales zonas de caza en el distrito e Ite.

### **3.2 Recursos:**

#### **Humanos: -**

Se contratará los servicios de un cazador especialista que tenga licencia de caza.

**Físicos o materiales.**

- Balanza digital.
- Hojas y mangos de bisturí.
- Jeringas agujas.
- Gradilla
- Linternas
- Cinta adhesiva
- Plumón indeleble
- Cámara fotográfica
- Útiles de escritorio
- Caja tecnopor
- Libreta de apuntes.
- Bolsas platicas.
- Guantes quirúrgicos
- Gel pak
- Jeringas
- Agujas N°21 x 1<sup>1/2</sup> pulgada.
- Mocheta
- Sogas sujeción

**Equipo de Caza.**

- Escopeta
- Balines
- Linterna
- Vestuario

**Útiles de escritorio.**

- Computadora portátil
- Útiles de escritorio.

**Vehículo motorizado**

- Camioneta doble cabina

**Recursos institucionales.**

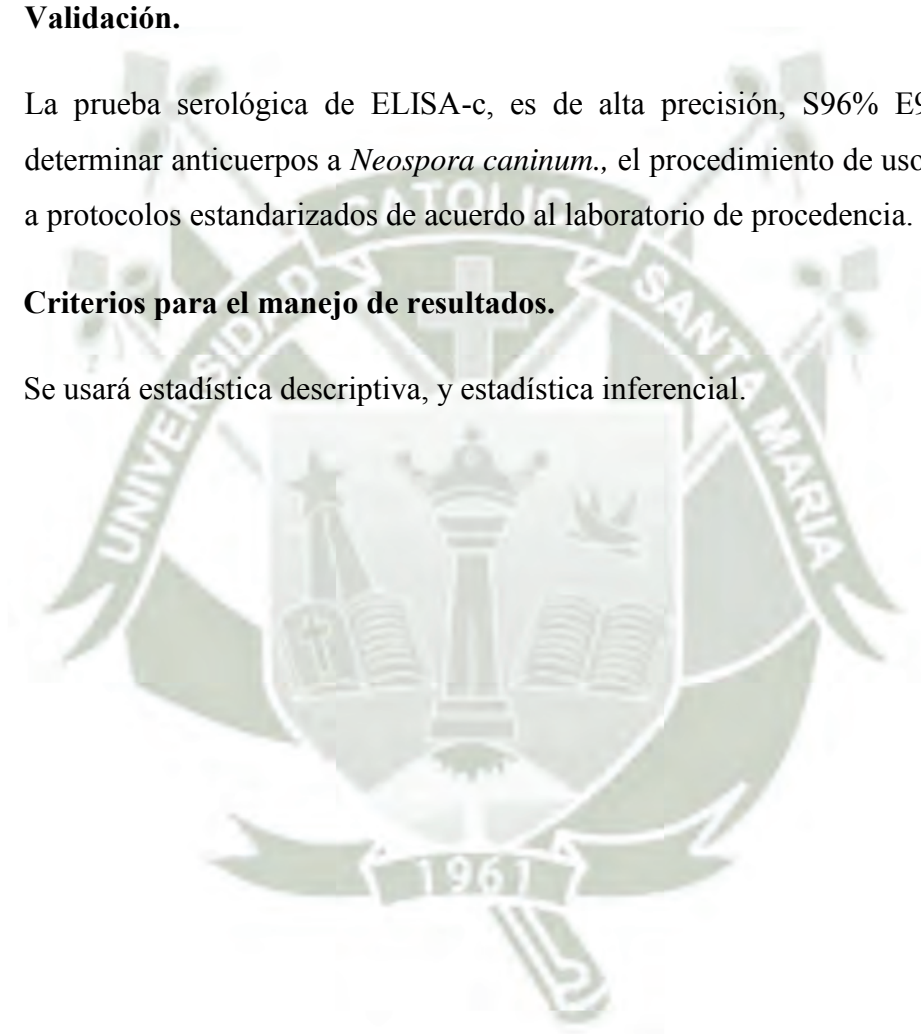
El Laboratorio Veterinario del Sur (LABVETSUR) será el encargado de realizar las pruebas serológicas de los sueros sanguíneos colectadas, emitiendo un reporte de resultados, de las muestras evaluadas, mediante la prueba de ELISA C, utilizando para este caso el kit comercial, *N. caninum* Antibody Test Kit ELISA c (VMRD® , Inc.).

**Validación.**

La prueba serológica de ELISA-c, es de alta precisión, S96% E99% para determinar anticuerpos a *Neospora caninum*., el procedimiento de uso se ajusta a protocolos estandarizados de acuerdo al laboratorio de procedencia.

**3.3 Criterios para el manejo de resultados.**

Se usará estadística descriptiva, y estadística inferencial.



## II. CRONOGRAMA DE TRABAJO

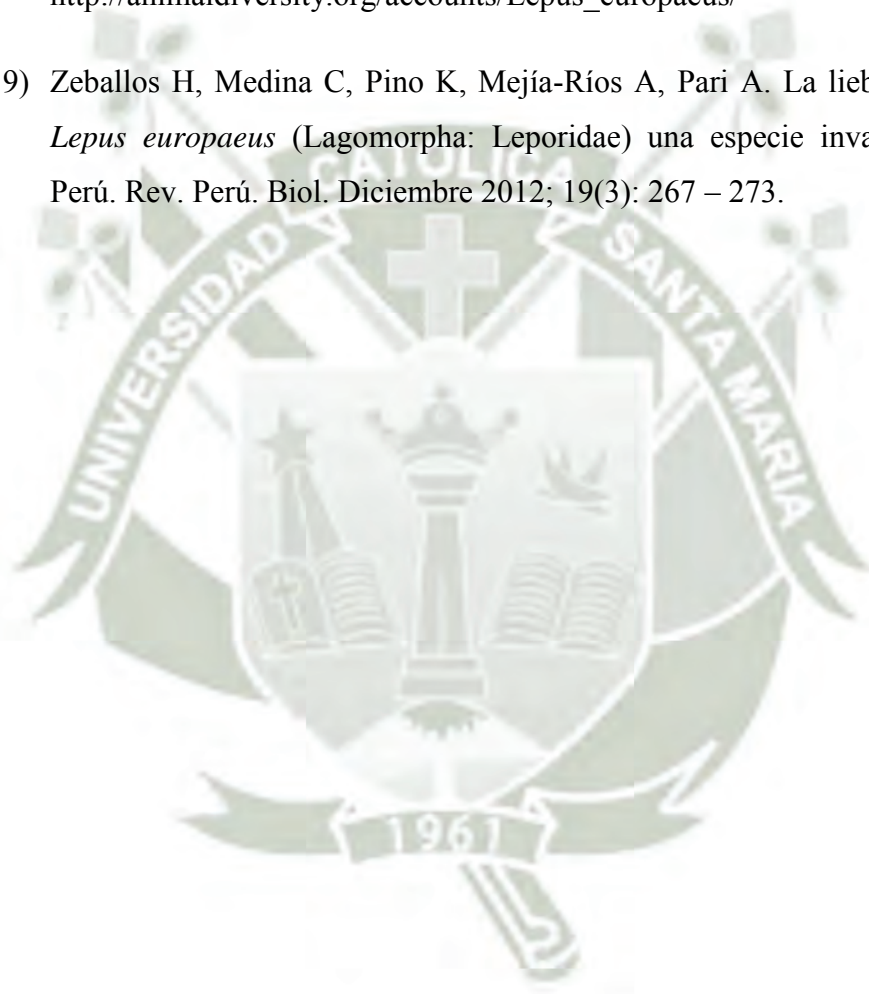
N. o	Actividades	2016																			
		Agosto				Setiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1.	Recolección de datos y sistematización				X	X	X														
2.	Sistematización análisis e interpretación de los datos							X	X	X	X	X	X	X	X	X					
3.	Informe final																X	X	X	X	X

### III. BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- (1) Albéitar, Informativo Veterinario. Neosporosis bovina. Zaragoza, España 2015; <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/13842/articulos-rumiantes/neosporosis-bovina.html>
- (2) Albéitar, Informativo Veterinario. Neosporosis. Zaragoza, España 2003; disponible en <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3396/articulos-rumiantes-archivo/neosporosis.html>.
- (3) Bonino N, Cossios D, Menegheti J. Dispersión de la liebre Europea (*Lepus europaeus*) en Sudamérica. Sitio Argentino de Producción Animal. 2008; Comunicación Técnica N° 152: Área Recursos Naturales, Fauna, ISSN 1667-4014.
- (4) Bonino NA. Especies exóticas invasoras en La Patagonia: El conejo europeo. Desde La Patagonia Difundiendo Saberes. 2009; Vol. 6 - N° 8. Pág. 39.
- (5) Cossíos D. La liebre europea, *Lepus europaeus* (Mammalia, Leporidae), especie invasora en el sur del Perú. Rev. Perú. Biol. 2004; 11(2): 209-212.
- (6) Cossíos ED. Vertebrados naturalizados en el Perú: historia y estado del conocimiento. Facultad de Ciencias Biológicas. Rev. Perú. Biol. Agosto 2010; 17(2): 179 – 189.
- (7) Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, y Šlapeta N. Una revisión de los hallazgos patológicos de la neosporosis y *Neospora caninum* la infección en los animales salvajes. Int J Parasitol parásitos Wild. Agosto 2015; (2): 216-238.
- (8) Morales Salinas E. Neosporosis Bovina. Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. PV ALBEITAR. Junio 2014; [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)

- (9) Paz Valenzuela. Neosporosis en bovinos y Caninos. Programa de Magíster en Ciencias Veterinarias. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. pazval70@yahoo.com.mx Mon. Electr. Patol. Vet. 2005; 2(1):17-33
- (10) Prando MD, Venturini MC, Campero CM. Avances en la Neosporosis bovina. Academia Nacional de Agronomía Veterinaria. TOMO LX. Noviembre 2006; ISSN 0327-8093
- (11) Risco CV. Identificación y Caracterización de Antígenos Específicos del Estadio de Bradizoíto de "*Neospora caninum*". Universidad Complutense de Madrid Memoria Para optar al Grado de Doctor. 2008; pág. 9, 10
- (12) Rodríguez AM. Transmisión Horizontal y Vertical de *Neospora Caninum* en tres Sistemas de Cría Bovina, Trabajo de tesis de Magister Scientiae En Sanidad Animal Balcarce, Argentina 2015; pág. 16 -20
- (13) Sales Guimarães M. Ciclo Silvestre de *Neospora Caninum* e sua Importância na Epidemiologia para os animais domésticos. 2011; pág. 11-12.
- (14) SERFOR. Campaña Informativa Sobre La Presencia De La Liebre Europea (*Lepus Europaeus*) en el sur del país y sobre los daños que puede ocasionar. 2015; pag. 7.
- (15) Servicio Nacional de Sanidad Agraria – SENASA. Programa de Desarrollo de la Sanidad Agraria e Inocuidad Agroalimentaria – PRODESA. Proyecto: Fortalecimiento del Sistema de Vigilancia Zoonosario Informe Final: Caracterización de la Diarrea Viral Bovina, Neosporosis Bovina y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina en el Perú. Dic. 2010.
- (16) Vaccaro O, Canevari M, Carrizo G. Guía de Mamíferos del Sur de América del Sur. 1ª. Ed. – Buenos Aires: L.O.L.A., 2007; 424p.; 22 x 15 cm. ISBN 978-950-9725-81-2

- (17) Venturini MC, Odeón AC, Moore DP, Campero CM. Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. Revista Argentina de Microbiología [en línea] 2005, 37 (Sin mes): [Fecha de consulta: 16 de julio de 2016] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016800011>> ISSN 0325-7541.
- (18) Vu A. "*Lepus europaeus*" (on-line), Diversidad de los Animales. 2001. Web. Consultado el 05 de mayo de 2016; [http://animaldiversity.org/accounts/Lepus\\_europaeus/](http://animaldiversity.org/accounts/Lepus_europaeus/)
- (19) Zeballos H, Medina C, Pino K, Mejía-Ríos A, Pari A. La liebre europea *Lepus europaeus* (Lagomorpha: Leporidae) una especie invasora en el Perú. Rev. Perú. Biol. Diciembre 2012; 19(3): 267 – 273.





**ANEXO N° 2:**  
**UBICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LA**  
**ZONA DE MUESTREO**

**MAPA N° 1:****UBICACIÓN DE LOS PUNTOS DE LA ZONA DE MUESTREO DE LIEBRES  
EUROPEAS Y VACUNOS DEL DISTRITO DE ITE**

En el mapa N° 1. Se puede observar que los puntos de muestreo se encuentran ubicados, en terrenos de cultivo que limitan con áreas desérticas, quebradas y cerros, convirtiéndose estas zonas en el hábitat y refugio de la liebre europea durante el día, retornando por la noche a las áreas de cultivo para alimentarse.

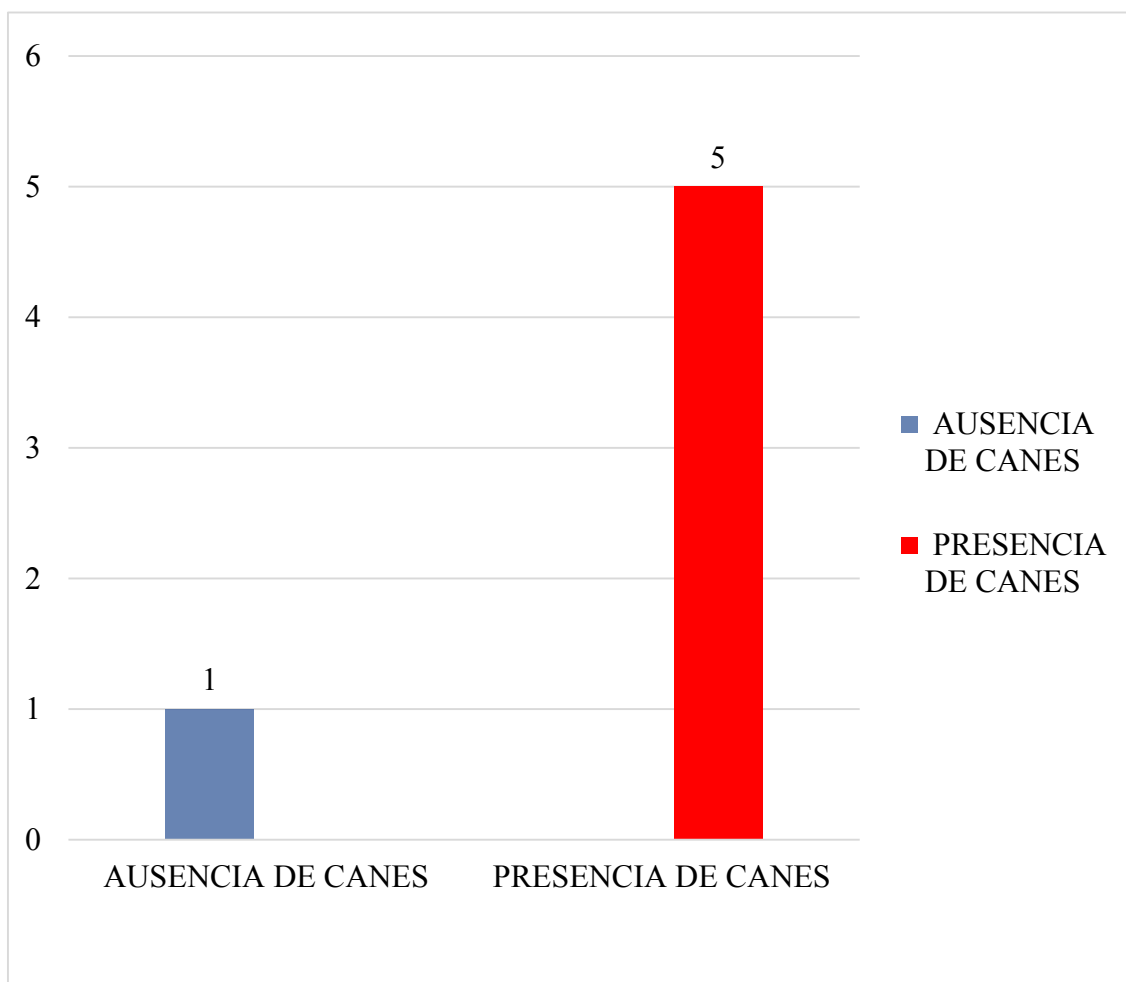
**TABLA N° 3:**  
**COORDENADAS UTM, UBICACIÓN DE LUGARES DE LA TOMA DE**  
**MUESTRAS DE SANGRE LIEBRES Y VACUNOS. ITE**

Puntos de muestreo (p)	Especie muestreada	Coordenadas UTM, ubicación de la muestra		Distancia entre puntos de muestreo (ml)
		X	Y	
1	Liebre	296480.99	8030616.76	(p1,p1)
	Vacuno	296416.33	8030594.89	0.ml
2	Liebre	296374.17	8029958.95	(p1,p2)
	Vacuno	296333.01	8030000.71	608.ml
3	Liebre	295687.53	8028657.80	(p2,p3)
	Vacuno	295720.86	8028605.44	1447.ml
4	Liebre	292895.96	8024003.78	(p3,p4)
	Vacuno	292715.12	8024092.21	5560.ml
5	Liebre	292088.20	8021690.73	(p4,p5)
		0	0	2354.ml
6	Liebre	290114.60	8021518.70	(p5,p6)
	Vacuno	290095.82	8021551.33	2022.ml

**ml:** metros lineales

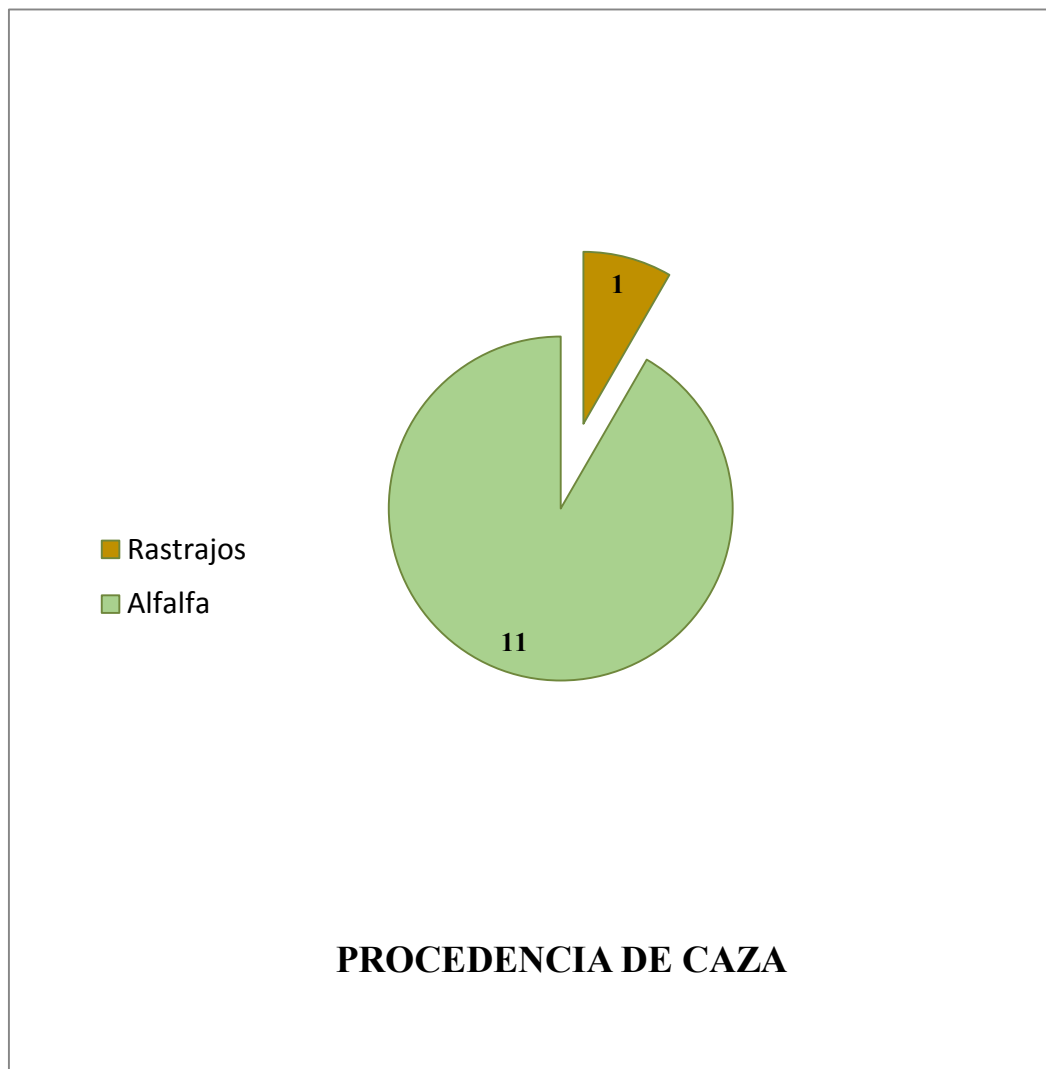
Se muestran las coordenadas UTM de ubicación, de los seis puntos de muestreo donde se colectó la sangre de las liebres europeas y vacunos, además se indica la distancia en metros lineales, entre cada punto de muestreo.

**GRÁFICO N° 5:**  
**LUGARES DE MUESTREO QUE TIENEN PRESENCIA DE CANES**



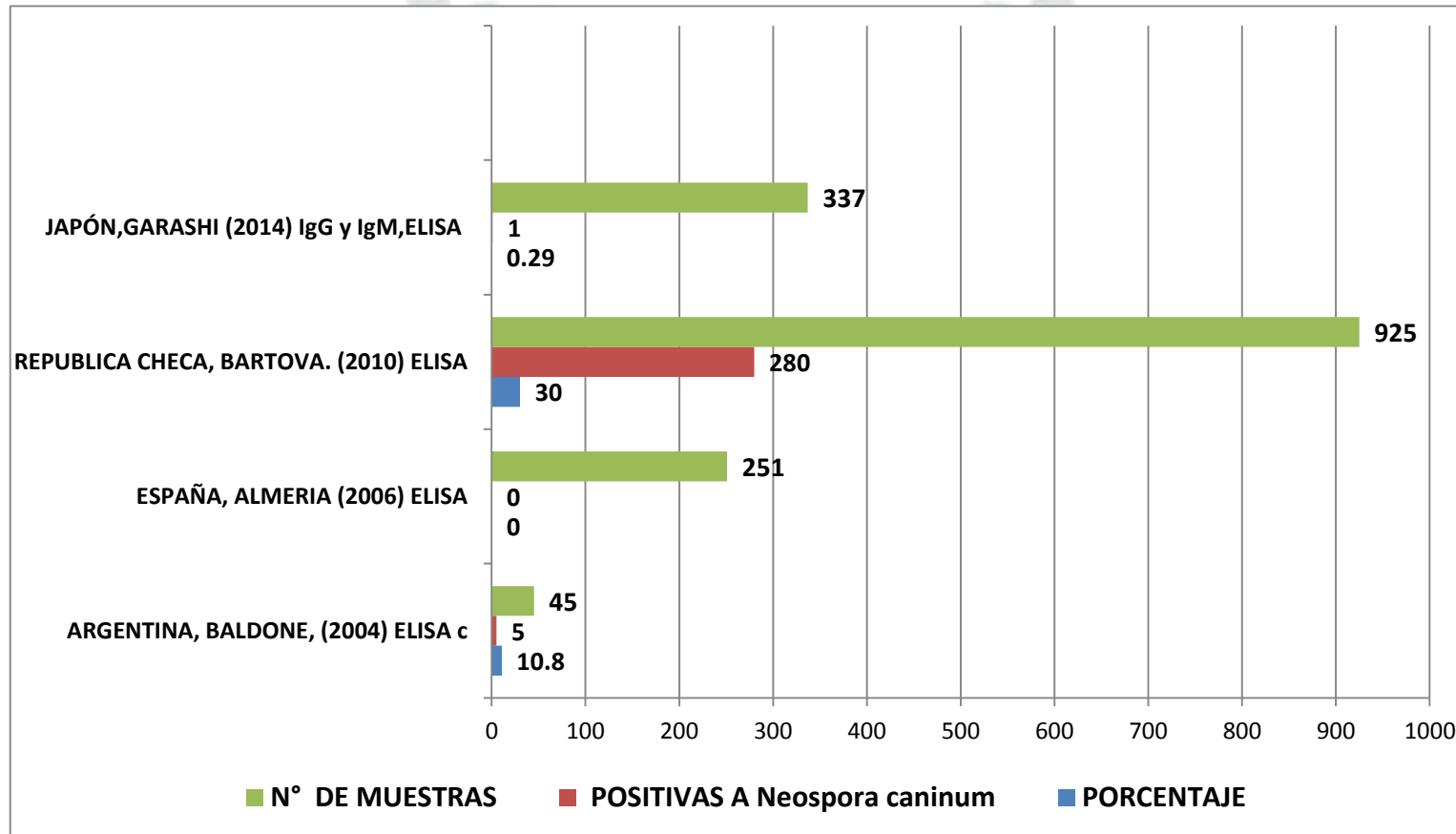
Se colectó muestras de sangre en seis lugares diferentes del distrito de Ite, en cinco de ellos se advirtió la presencia de canes domésticos, siendo solo en un punto de muestreo, donde no se registró la presencia de esta especie.

**GRÁFICO N° 6:  
PROCEDENCIA DONDE FUERON CAZADAS LAS LIEBRES EUROPEAS DE  
ITE.**

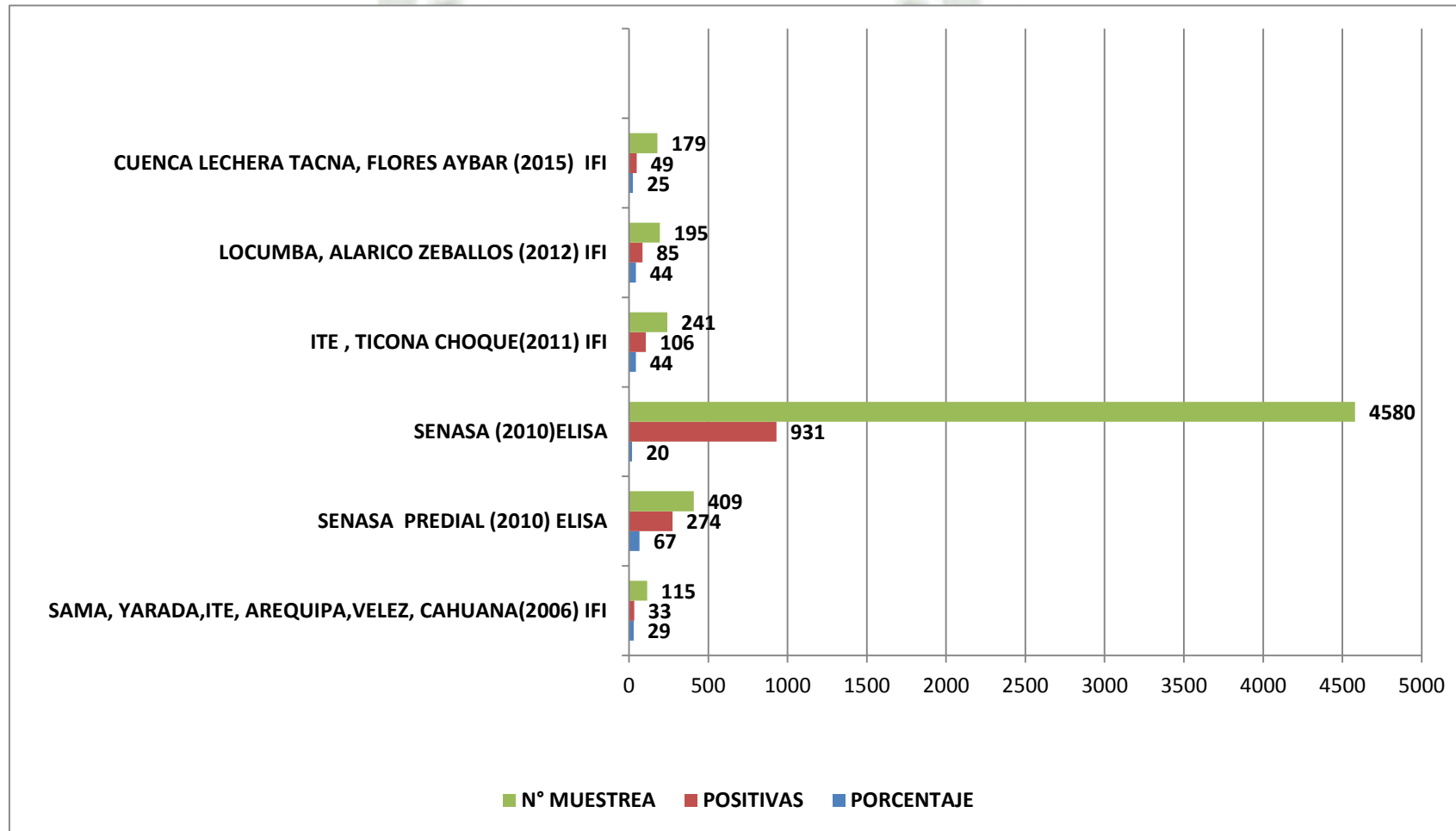



Doce liebres europeas se cazaron para realizar nuestro estudio, once procedieron de alfalfares donde pastorea el ganado vacuno, y solo una fue cazada en un rastrojo de maíz

**GRÁFICO N° 7:**  
**TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN DE *Neospora caninum* EN LAGOMORFOS**



**GRÁFICO N° 8:**  
**TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN DE *Neospora caninum* EN VACUNOS DE TACNA**





**ANEXO N° 3:**  
**RESULTADOS DE LABORATORIO**



<b>ENVIADO POR:</b>	<b>FECHA DE INFORME:</b> 19/09/2016
<b>DIRECCION:</b>	<b>Nro. DE DIAG:</b> 594
	<b>REFERENCIA:</b> V4/9-16
	<b>FECHA DE ENVIO:</b> 6/09/2016
	<b>FECHA DE RECIBIDO:</b> 6/09/2017

**REPORTE DE EXAMENES**

<b>PROPIETARIO:</b> Marcos Neira Huamani	<b>ANIMAL N°:</b>
<b>DIRECCION:</b>	<b>ESPECIE/LAB.:</b> Varios
<b>LOCALIDAD:</b> Ite - Locumba	<b>RAZA:</b> Liebres Europeas
<b>PROVINCIA:</b> Jorge Basadre	<b>SEXO:</b>
<b>DPTO:</b> Tacna	<b>EDAD:</b>

**HISTORIA**

**PRUEBAS REALIZADAS:**

Laboratorio	Muestras	Total	Prueba
INMUNOLOGIA	SANGRE	13	Neospora

**RESULTADOS**

Nro	IDENTIFICACION	SEXO	PROCEDENCIA	NEOSPORA
1	1	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
2	2	Macho	La Pampa	S.R Negativo
3	3	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
4	4	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
5	5	Macho	La Pampa	S.R Negativo
6	6	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
7	7	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
8	8	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
9	9	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
10	10	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
11	11	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
12	12	Hembra	La Pampa	S.R Negativo
13	13	Hembra	La Pampa	S.R Negativo

S.R. : Sero - reactor

**Material y método empleado:**

ELISA indirecta, detección de anticuerpos. KIT VMRD - USA.



Av. Alfonso Ugarte N° 500-A  
Teléfonos: 054-213677 - 232175  
e-mail: labvetsur@hotmail.com  
Arequipa - Perú



<b>ENVIADO POR:</b>	<b>FECHA DE INFORME:</b>	19/09/2016
	<b>Nro. DE DIAG:</b>	621
	<b>REFERENCIA:</b>	B22/9-16
<b>DIRECCION:</b>	<b>FECHA DE ENVIO:</b>	15/09/2016
	<b>FECHA DE RECIBIDO:</b>	15/09/2017

**REPORTE DE EXAMENES**

<b>PROPIETARIO:</b> Marcos Neira Huamani	<b>ANIMAL N°:</b>
<b>DIRECCION:</b>	<b>ESPECIE/LAB.:</b> Bovinos
<b>LOCALIDAD:</b> Ite - Locumba	<b>RAZA:</b> Holstein
<b>PROVINCIA:</b> Jorge Basadre	<b>SEXO:</b> Hembras
<b>DPTO:</b> Tacna	<b>EDAD:</b> No Indica

**HISTORIA**

**PRUEBAS REALIZADAS:**

Laboratorio	Muestras	Total	Prueba
INMUNOLOGIA	SANGRE	12	Neospora

**RESULTADOS**

Nro	IDENTIFICACION	NEOSPORA
1	1	S.R Positivo
2	2	S.R Negativo
3	3	S.R Negativo
4	4	S.R Negativo
5	5	S.R Negativo
6	6	S.R Negativo
7	8	S.R Positivo
8	9	S.R Positivo
9	9	S.R Negativo
10	10	S.R Negativo
11	11	S.R Positivo
12	12	S.R Negativo

S.R. : Sero - reactor

**Material y método empleado:**

ELISA indirecta, detección de anticuerpos. KIT VMRD - USA.



Q.F. Claudia Choque Calaga  
COEP 05333

Av. Alfonso Ugarte N° 500-A  
Teléfonos: 054-213677 - 232175  
e-mail: labvetsur@hotmail.com  
Arequipa - Perú

Software Version 2.07.17

Experiment File Path: C:\Users\user\Desktop\IV4, B22 -9.xpt  
Protocol File Path:

Plate Number Plate 1  
Date 19/09/2016  
Time 01:39:50 p.m.  
Reader Type: ELx808  
Reader Serial Number: Unknown  
Reading Type Reader

### Procedure Details

Plate Type 96 WELL PLATE  
Read Absorbance Endpoint  
Full Plate  
Wavelengths: 650  
Read Speed: Normal



Dra. Claudia Choque  
001101523

### Layout

	1	2	3	4	5	6	
A	NEG	SPL5	SPL13	SPL21			Well ID
B	NEG	SPL6	SPL14	SPL22			Well ID
C	POS	SPL7	SPL15	SPL23			Well ID
D	POS	SPL8	SPL16	SPL24			Well ID
E	SPL1	SPL9	SPL17	SPL25			Well ID
F	SPL2	SPL10	SPL18				Well ID
G	SPL3	SPL11	SPL19				Well ID
H	SPL4	SPL12	SPL20				Well ID

### Results

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	1.187	0.938	0.941	0.320									650
B	1.067	1.019	0.219	1.088									650
C	0.461	0.966	1.014	1.388									650
D	0.452	0.929	1.483	0.220									650
E	0.904	1.006	1.007	0.839									650
F	0.951	1.054	0.947										650
G	0.978	1.085	0.973										650
H	1.019	0.957	0.690										650

**TABLA N° 4:**  
**RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA c, VMD®, INC.**

N° MUESTRAS	LIEBRES EUROPEAS			VACUNOS		
	DENSIDAD ÓPTICA (DO)	CALCULO DEL (%) DE INHIBICIÓN CONTROL NEGATIVO, DE LA (DO)	POSITIVO ≥ 30% NEGATIVO < 30%	DENSIDAD OPTICA (DO)	CALCULO DEL (%) DE INHIBICIÓN CONTROL NEGATIVO, DE LA (DO)	POSITIVO ≥ 30% NEGATIVO < 30%
1	0.904	19.787	S.R NEGATIVO	0.219	80.568	S.R POSITIVO
2	0.951	15.617	S.R NEGATIVO	1.014	10.027	S.R NEGATIVO
3	0.978	13.221	S.R NEGATIVO	1.483	-31.588	S.R NEGATIVO
4	1.019	9.583	S.R NEGATIVO	1.007	10.648	S.R NEGATIVO
5	0.938	16.770	S.R NEGATIVO	0.947	15.972	S.R NEGATIVO
6	1.019	9.583	S.R NEGATIVO	0.973	13.665	S.R NEGATIVO
7	0.966	14.286	S.R NEGATIVO	0.690	38.776	S.R POSITIVO
8	0.929	17.569	S.R NEGATIVO	0.320	71.606	S.R POSITIVO
9	1.006	10.736	S.R NEGATIVO	1.088	3.461	S.R NEGATIVO
10	1.054	6.477	S.R NEGATIVO	1.388	-23.159	S.R NEGATIVO
11	1.085	3.727	S.R NEGATIVO	0.220	80.479	S.R POSITIVO
12	0.957	15.084	S.R NEGATIVO	0.839	25.555	S.R NEGATIVO


**Formula del Porcentaje de inhibición (% I):** % I = 100 [1-(muestra. D.O ÷ CN D.O)]

**Control negativo, de la densidad óptica (CN, DO) =1.127**

**S.R:** Sero Reactor

**DO:** Densidad Óptica

**CN:** Control Negativo



**ANEXO N° 4:**  
**AUTORIZACIÓN DE CAZA DE LIEBRES**  
**EUROPEAS – SERFOR**



**RESOLUCIÓN ADMINISTRATIVA N° 0114-2016-SERFOR-ATFFS MOQUEGUA-TACNA**

Que, el INFORME TÉCNICO N° 021-2016-SERFOR-ATFFS MOQUEGUA TACNA-JEFE SEDE TACNA y el INFORME TÉCNICO LEGAL N° 0087-2016-SERFOR ATFFS MOQUEGUA TACNA/DCR concluyen que la solicitud, cumple con los aspectos técnicos y legales que permiten su aprobación, conforme a los detalles que obran en el Plan de Investigación, que forma parte integrante de la presente resolución;

Que, en uso de las funciones atribuidas por la Primera Disposición Complementaria Transitoria del Decreto Supremo N° 016-2014-MINAGRI modificatoria del Decreto Supremo N° 007-2013 Reglamento de Organización y Funciones del SERFOR, en concordancia con la Resolución de Dirección Ejecutiva N° 080-2014-SERFOR-DE;

**SE RESUELVE:**

**Artículo 1°.-** Otorgar la autorización con fines de investigación científica de fauna silvestre, al **MVZ. MARCOS LEANDRO NEIRA HUAMANI** identificado con DNI N° 29595150, cuyo Plan de Investigación forma parte integrante de la presente resolución; se le asigna el Código de Autorización N° **23-MOT-AUT-IFS-2016-001**;

**Artículo 2°.-** La autorización otorgada por el artículo precedente, incluye la caza de 16 especímenes vivos de la especie *Lepus europaeus* (liebre europea); de cada ejemplar podrá coleccionar 10 ml de sangre con un total de 160 ml, para el análisis en laboratorio mediante el método de Ensayo inmunoenzimático de competición (ELISA-c) para *Neospora caninum* (antibody Test Kit, VMRD), solicitado como parte del Plan de Investigación titulado "*Relación de los niveles de anticuerpos a Neospora caninum en la liebre europea (Lepus europaeus) con los encontrados en vacunos (Bos taurus) del distrito de Ite, Tacna 2016*"

**Artículo 3°.-** La caza de los ejemplares a que se contrae la presente resolución, deberá realizarse por un cazador debidamente habilitado;

**Artículo 4°.-** Los despojos resultantes de la caza de los especímenes autorizados deberán disponerse con arreglo a lo establecido por literal "d." del Artículo 108° del Reglamento, aplicable supletoriamente;

**Artículo 5°.-** La presente autorización tiene una vigencia de cuarenta y cinco días calendarios, contados a partir del día siguiente a su notificación, la misma que se encuentra a cargo del investigador MVZ. MARCOS LEANDRO NEIRA HUAMANI;

**Artículo 6°.-** Las actividades de investigación que se autoriza por ésta resolución es de carácter regional y se desarrollará en el ámbito que se detalla en el siguiente cuadro:



DATUM: WGS84				
SISTEMA DE COORDENADAS UTM – ZONA 19S				
DEPARTAMENTO	PROVINCIA	DISTRITO	ESTE (X)	NORTE (Y)
TACNA	JORGE BASADRE	LOCUMBA	312261.8682	8081100.6168
			315056.8742	8085200.9072
	ITE	295943.2606	8026546.7778	
		293903.4364	8023286.8788	

**Artículo 7°.-** El titular de la autorización para actividades de investigación de fauna silvestre genera las siguientes obligaciones:

- No extraer especímenes, ni muestras biológicas de fauna silvestre no autorizada.
- No ceder el material colectado a terceros, ni utilizarlo para fines distintos a lo autorizado.
- Entregar al SERFOR un informe final en idioma español, incluyendo una versión digital, como resultado de la investigación autorizada, así como copia de las publicaciones realizadas en las que se indicará expresamente el Código de Autorización. El plazo para la entrega del informe no deberá exceder los seis meses (06) al vencimiento de la presente autorización.
- Depositar el material colectado en una institución científica nacional depositaria de material biológico y entregar al SERFOR la constancia de dicho depósito. En casos debidamente justificados, y siempre

- que el material colectado no constituya holotipos ni ejemplares únicos, el depósito se puede realizar en una institución distinta a la mencionada; para ello se requiere la autorización del SERFOR.
- e) Si por razones científicas, se requiere enviar al extranjero parte del material colectado, el interesado deberá gestionar el correspondiente Permiso para la Exportación ante el SERFOR, así como pasar el control respectivo.
  - f) El Informe final deberá contener una lista de las coordenadas en formato UTM (Datum WGS84), de los lugares en que se hubiere realizado la caza de los ejemplares.

**Artículo 8°.-** Exhortar al titular de la presente autorización, cumplir en estricto con las disposiciones legales en materia forestal y de fauna silvestre, caso contrario se procederá a instaurar procedimiento administrativo sancionador.

**Artículo 9°.-** La Administración Técnica Forestal y Fauna Silvestre se **RESERVA** el derecho de fiscalización posterior respecto de la información documental proporcionada por el administrado en el presente procedimiento administrativo.

**Artículo 10°.-** Transcribese copia de la presente resolución a la Dirección de Información y Registro para los fines de Ley;

**REGÍSTRESE Y COMUNÍQUESE.**



SERVICIO NACIONAL FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE  
SERFOR

Lic. G. Christian Riveros Arteaga  
Administrador Técnico  
ATFES Moquegua-Tacna





**ANEXO N° 5:**  
**SECUENCIA FOTOGRÁFICA**

**Fotografía N° 1**



Reconocimiento de la zona de caza de liebres europeas en el sector Pampa Baja – Ite.

**Fotografía N° 2**



Reconocimiento de la zona de caza de liebres europeas en el sector Pampa Alta – Ite.

**Fotografía N° 3**



Preparación de los cazadores y logística de caza

**Fotografía N° 4**



Se muestra una liebre europea cazada en el sector Pampa Alta Ite.

**Fotografía N° 5**



Se muestra una liebre europea cazada en el sector Pampa Baja Ite.

**Fotografía N° 6**



Se muestra una liebre europea cazada cuando consumía alfalfa del campo de pastoreo de vacunos

**Fotografía N° 7**



Se muestra una liebre europea cazada en el sector de Pampa Alta – Ite.

**Fotografía N° 8**



Acondicionando la liebre europea para la colección de muestra de sangre

**Fotografía N° 9**



Características de uno de los establos de Ite

**Fotografía N° 10**



Colección de muestras sangre en vacunos.

**Fotografía N° 11**



Colección de muestras sangre en vacunos

**Fotografía N° 12**



Centrifugación de las muestras de sangre.

**Fotografía N° 13**



Obtención de sueros sanguíneos.

**Fotografía N° 14**



Muestras de suero sanguíneo conservadas en estado de congelación  $-20^{\circ}\text{C}$

Fotografía N° 15



Kit comercial, *N. caninum*, Antibody Test Kit ELISA c (VMRD, ® Inc.).

Fotografía N° 16



Muestra el equipo de laboratorio para realizar análisis de muestras.

**Fotografía N° 16**



Procesamiento de sueros de liebres europeas y vacunos.

**Fotografía N° 16**



Aplicación del procedimiento de la prueba de ELISA c.

**Fotografía N° 17**



Utilización de la lectora de ELISA.

**Fotografía N° 18**



Software para la lectura e interpretación de resultados.



**ANEXO N° 6:**  
**CARTA DE PRESENTACIÓN**



## Universidad Católica de Santa María

☎ (51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ✉ [ucsm@ucsm.edu.pe](mailto:ucsm@ucsm.edu.pe) 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

AREQUIPA - PERÚ

« IN SCIENTIA ET FIDE EST FORTITUDO NOSTRA »  
(En la Ciencia y en la Fe está nuestra Fortaleza)

Arequipa, 25 de octubre del 2016

### Oficio N° 892-EPG-2016

Señor  
**JEFE DEL SERVICIO NACIONAL FORESTAL Y  
DE FAUNA SILVESTRE – SERFOR**  
Tacna.-

De mi mayor consideración:

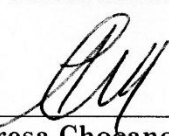
Es grato dirigirme a usted para presentarle al **Bach. Marcos Leandro Neira Huamaní**, alumno de la Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia de esta Casa Superior de Estudios, quien se encuentra desarrollando su tesis titulada **“Relación de los Niveles de Anticuerpos A (neóspora caninum) en la Liebre Europea (Lepus europaeus) con los Encontrados en Vacunos (Bos taurus), del Distrito de Ite, Tacna 2016”**, con la cual pretende optar el Grado Académico de Magister.

En tal sentido, solicito a su Despacho se sirva otorgar su autorización, a fin de que se le brinde las facilidades del caso para que nuestro alumno pueda tomar muestras en líderes europeas entre los meses de octubre a diciembre, en el distrito de Ite, Locumba - Tacna, lo que le permitirá lograr su objetivo académico.

Agradeciéndole por la atención dispensada, reitero a usted los sentimientos de mi especial consideración.

Atentamente,



  
Dra. Teresa Chocano Rosas  
Directora (e) de la Escuela de Postgrado

HTP/DEPG  
gjc  
c.c.