

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DELCUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE ZOOTECNIA



“DETECCIÓN DEL ADN DE *Neospora caninum* EN SUERO SANGUÍNEO POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT- PCR), EN VACAS DE LA PAMPA DE ANTA - CUSCO, 2019”

Tesis presentada por la Bachiller en Ciencias Agrarias:

JENNY HUARANCCA VARGAS, para

Optar al título profesional de

INGENIERO ZOOTECNISTA

ASESORES:

M.V.Z. M. Sc. EDGAR ALBERTO VALDEZ

GUTIÉRREZ

ING. ZOOT. FIORELA K. FERNÁNDEZ

BUSTINZA

PATROCINADOR: Proyecto “Evaluación de la Eficiencia Reproductiva en Vacas de la Pampa de Anta “VIA CANON UNSAAC”.

K´AYRA - 2021

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico a Dios, por dejarme llegar a este momento tan especial de mi vida, por darme salud y confianza para lograr mis sueños.

A mi madre Martha, la persona que siempre estuvo apoyándome y haciéndome sentir capaz de lograr mis metas, gracias por estar siempre a mi lado a pesar de los errores cometidos.

A mi hija Lucia y a mi esposo José Luis, por impulsarme a seguir adelante, a pesar de todas las circunstancias.

A mis amigas del laboratorio de Sanidad animal "M.V. Atilio Pacheco Pacheco": Milagros, Fiorela Fernández, Fiorela, Cheydi, Grisel, Yesica, gracias por compartir muchas cosas juntas, pasamos cosas bonitas, que nuestra amistad perdure a lo largo de los años.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, que hizo realidad mis sueños y aspiraciones, a la Facultad de Ciencias Agrarias por haberme brindado la oportunidad de formar parte de esta hermosa familia académica y así forjar mi profesión.

A todos mis docentes de la Escuela Profesional de Zootecnia por compartir sus valiosos conocimientos en sus enseñanzas durante mi formación académica.

Mi especial reconocimiento al Proyecto de investigación “Evaluación de la Eficiencia Reproductiva en Vacas de la Pampa de Anta”, VIA CANON — UNSAAC”, por el financiamiento brindado para la ejecución de este Proyecto de investigación. Mi especial gratitud a mi asesor el MVZ. MSc. Edgar Alberto Valdez Gutiérrez, quien, con su comprensión, su apoyo incondicional y la confianza brindada, conocimientos compartidos y sobre todo por el asesoramiento en la ejecución del presente trabajo de investigación.

Mi especial gratitud a mi asesora Ing Zoot. Fiorela Katterine Fernández Bustinza, por el apoyo incondicional, por los conocimientos compartidos y sobre todo por el asesoramiento en la ejecución del presente trabajo de investigación.

A todos mis amigos y compañeros con los que compartí tantos bellos momentos durante mi formación académica, gracias a cada uno, por ayudarme a crecer como persona y por la amistad que me brindaron.

INDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
INDICE.....	iii
INDICE DE TABLAS	v
INDICE DE GRAFICOS	vi
INDICE DE ANEXOS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
GLOSARIO	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCION	xi
I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACION	1
1.1 IDENTIFICACION DEL PROBLEMA.....	1
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION	2
2.1 OBJETIVO GENERAL	2
2.2 OBJETIVO ESPECIFICO	2
2.3 JUSTIFICACION.....	3
III. MARCO TEORICO	4
3.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION	4
3.2 BASES TEORICAS.....	7
3.2.1 <i>Neospora caninum</i>	7

3.2.2 Historia	8
3.2.3 Agente etiológico	9
3.2.4 Estadios parasitarios	10
3.2.5 Ciclo de vida.....	11
3.2.6 Vías de transmisión	13
3.2.7 Patogénesis.....	15
3.2.8 Signos clínicos.....	16
3.2.9 Gestación e inmunidad frente al <i>Neospora caninum</i>	17
3.2.10 Diagnóstico.....	19
3.2.11 Neosporosis Bovina	20
3.2.12 Prevalencia.....	20
3.2.13 Patogénesis del aborto.....	20
3.2.14 Genoma.....	21
3.2.15 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	21
IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	22
4.1 ÁMBITO DE ESTUDIO.....	22
4.1.1 Ubicación política	23
4.1.2 Ubicación geográfica	23
4.1.3 Clima	23
4.2 MATERIALES DE ESTUDIO	24
4.2.1 Población.....	24
4.2.2 Muestra	24
4.2.3 Tamaño de muestra	24
4.2.4 Instrumentos y equipos para el procesamiento de muestras	25
4.2.5 Materiales para el procesamiento de muestras.....	25

4.2.6 reactivos y tipo de muestra para el análisis del ADN del <i>Neospora caninum</i>	26
4.3 METODOLOGÍA DE LABORATORIO	27
4.4 METODOLOGÍA DE RT - PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ADN DEL PARASITO DE LA <i>NEOSPORA CANINUM</i> EN SUERO SANGUÍNEO.	28
4.4.1 Principios de la prueba	28
4.4.2 Extracción del material genético.....	28
4.4.3 Identificación del ADN del paràsito de la <i>Neospora caninum</i> en suero sanguíneo por RT – PCR (<i>genesig Primerdesign</i>).....	31
4.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	37
4.6 CONCENTRACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO DEL SUERO SANGUÍNEO DE LAS MUESTRAS.....	37
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	38
5.1 PREVALENCIA DE LAS MUESTRAS POSITIVAS AL GENOMA DEL PARÀSITO DEL <i>NEOSPORA CANINUM</i>	38
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
6.1 CONCLUSION	52
6.2 RECOMENDACIONES.....	53
VII. BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	61

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 01: Resumen de Antecedentes para la detección del ADN del parásito <i>Neospora caninum</i>	08
Tabla 02: Estadios parasitarios del parásito <i>Neospora caninum</i>	11
Tabla 03: Distribución de muestras de suero sanguíneo de vacunos seronegativos al <i>Neospora caninum</i>	27
Tabla 04: Cantidad de reactivo por reacción para las soluciones a utilizar.....	30
Tabla 05: Cantidad de agua libre de nucleasas para la reconstitución de los componentes del kit.....	33
Tabla 06: Cantidad de reactivos para la preparación de la mezcla Master mix.	34
Tabla 07: Tiempos y temperaturas para la amplificación del PCR en tiempo real	35
Tabla 08: Interpretación de los resultados de las pruebas evaluadas	38
Tabla 09: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Cachimayo	40
Tabla 10: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Anta.....	42
Tabla 11: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Ancahuasi.....	44
Tabla 12: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Huarcocondo.....	46
Tabla 13: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Zurite	48

Tabla 14: Concentración de los ácidos nucleicos extraídos del suero sanguíneo	49
Tabla 15: Resultado de las muestras positivas y negativas al ADN del parásito <i>Neospora Caninum</i> por distrito.....	50
Tabla 16: Prevalencia del ADN del parásito del <i>Neospora caninum</i> en la Pampa de Anta.....	50

INDICE DE GRAFICOS

	Pág.
Gráfico 1: Flujograma del trabajo de investigación para la detección del ADN del <i>Neospora caninum</i>	29
Gráfico 2: Flujograma de la extracción del material genético.....	36
Gráfico 3: Flujograma de identificación del ADN del parásito <i>Neospora caninum</i> por RT – PCR	37
Grafico 04: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito <i>Neospora caninum</i> en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Cachimayo	39
Gráfico 05: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito <i>Neospora caninum</i> en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Anta	41
Gráfico 06: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito <i>Neospora caninum</i> en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Ancahuasi	43
Gráfico 07: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito <i>Neospora caninum</i> en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Huarcondo	45
Gráfico 08: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito <i>Neospora caninum</i> en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Zurite	47

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 01: Cálculos para determinar el tamaño de muestras con resultados negativos a la prueba de ELISA	62
Anexo 02: Cálculos para determinar la prevalencia del ADN del parásito <i>Neospora caninum</i> en vacas de la Pampa de Anta	63
Anexo 03: EPP (Equipos de materiales de protección), utilizados al momento de realizar la prueba de PCR-RT.....	64
Anexo 04: Materiales y equipos utilizados para la extracción y detección del ADN del <i>Neospora caninum</i>	65
Anexo 05: Reactivos utilizados para la extracción del material genético del parásito <i>Neospora caninum</i>	67
Anexo 06: Reactivos utilizados para la identificación del genoma del parásito <i>Neospora caninum</i>	68
Anexo 07: Concentraciones del material genético extraído del suero sanguíneo de las 80 muestras	69
Anexo 08: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN de <i>Neospora caninum</i> a la prueba del PCR-TR del distrito de Cachimayo.....	70
Anexo 09: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN de <i>Neospora caninum</i> a la prueba del PCR-TR del distrito de Anta.....	71
Anexo 10: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN de <i>Neospora caninum</i> a la prueba del PCR-TR del distrito de Ancahuasi.....	72

Anexo 11: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN de <i>Neospora caninum</i> a la prueba del PCR-TR del distrito de Huarcocondo.....	73
Anexo 12: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN de <i>Neospora caninum</i> a la prueba del PCR-TR del distrito de Zurite.....	74
Anexo 13: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Cachimayo	75
Anexo 14: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Anta.....	76
Anexo 15: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Ancahuasi.....	77
Anexo 16: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Huarcocondo	78
Anexo 17: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Zurite	79

INDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 01: Mapa geográfico Anta y sus distritos.....	24

GLOSARIO

- **Ct:** ciclo umbral
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- **ARN:** Ácido ribonucleico
- **ELISA:** Ensayo por Inmunoabsorción ligada a la Enzima
- **CP:** Control positivo
- **CN:** Control negativo
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **LU:** Lisis unión.
- **PK/B:** Proteína k/perlas magnéticas
- **RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- **ng/ul:** Nanogramos/microlitro
- **PATOGNOMÓNICO:** Manifestaciones comprobables por el especialista o síntomas (manifestaciones percibidas subjetivamente por el paciente)
- **ATAXIA:** Se observa anormalidades en la marcha del vacuno.
- **TROPISMO:** Tendencia de un organismo a reaccionar de una manera definida a los estímulos exteriores.
- **RESUSPENSION:** Es el mecanismo mediante el cual el sedimento del fondo es incorporado a la columna de agua debido a la acción de los flujos que actúan cerca del fondo.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo detectar el ADN del parásito *Neospora caninum*, vector causante de abortos y nacimiento de crías crónicamente infectadas en vacas de la Pampa de Anta de la Región Cusco. Se trabajó con un total de 80 muestras de suero sanguíneo. El diagnóstico se realizó en el laboratorio de: “Sanidad Animal M.V. Atilio Pacheco Pacheco” mediante el método de PCR-RT (reacción en cadena de la polimerasa). Se ha detectado 20 muestras positivas al ADN del parásito *Neospora caninum*, obteniendo así una prevalencia de $25 \pm 0.08\%$ (20/80). Asimismo, se ha determinado la concentración de los ácidos nucleicos de todo el suero sanguíneo de las muestras corridas a la prueba de PCR-RT, estos valores se encuentran de 1.810 a 1.981 ng/ μ l de muestra. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, muestran la presencia del ADN del parásito *Neospora caninum* en vacas de la Pampa de anta, las cuales son portadoras del parásito.

Palabras clave:

Neospora caninum, PCR – TR, ADN, Neosporosis bovina.

INTRODUCCION

La ganadería en el Perú es una actividad importante de la producción agropecuaria, se estima una población bovina a nivel nacional de 5 575 483 cabezas y en la Región Cusco es de 429 684 cabezas (INEI, 2012), mientras que la Provincia de Anta es poseedora de una población de 53, 177 cabezas de ganado vacuno (IV Censo Nacional Agropecuario, 2012). Siendo una Región inminentemente ganadera. La crianza de ganado vacuno es una actividad de gran importancia para los productores de las provincias altas de la Región Cusco, particularmente en la provincia de Anta la crianza de ganado vacuno, es una fuente de ingresos económicos para las familias (Municipalidad Provincial de Anta, 2014).

La Neosporosis es considerada como una de las enfermedades parasitarias que causa grandes pérdidas económicas al sector ganadero a nivel mundial, Su agente causal la *Neospora caninum* es un protozoo que ha adquirido gran importancia al estar implicado como uno de los principales patógenos causantes de aborto en el ganado vacuno (Puray *et al.*, 2006). En el Perú, estudios realizados en el ganado bovino registran la presencia de *Neospora caninum*, con prevalencias que varían entre el 30 al 57% en las cuencas lecheras de Lima y Arequipa (Andresen, 1999; Silva *et al.*, 2002).

El parásito *Neospora caninum* afecta a cualquier tipo de ganado de cualquier edad, aunque haya tenido mayor impacto económico en el ganado lechero. Se caracteriza por provocar abortos, el nacimiento de becerros clínicamente sanos, pero crónicamente infectados que favorecen la permanencia de esta parasitosis en los hatos, o el nacimiento de becerros débiles y con signos clínicos. Las principales pérdidas económicas para los productores de ganado se relacionan con las muertes fetales y el desecho de vacas (Dubey & Schares, 2006).

El uso de la PCR en tiempo real posee numerosas ventajas sobre las técnicas de PCR convencionales, como la amplificación, detección y cuantificación del producto, además de una alta sensibilidad y especificidad en un mismo proceso, posibilitando el análisis de un elevado número de muestras y obviando la necesidad de manipulaciones después de la PCR, reduciendo así el riesgo de posibles contaminaciones y acortando el periodo de tiempo en el que se obtienen los resultados (UCM, 2019). Es por ello que, en el presente trabajo de investigación se realizó la “Detección del ADN de *Neospora caninum* en suero sanguíneo por PCR en tiempo real en vacas de la Pampa de Anta”, con la finalidad de aportar al conocimiento sobre este parásito que ocasiona grandes pérdidas económicas en la producción de vacunos.

I. PROBLEMA OBJETO DE INVESTIGACION

1.1 IDENTIFICACION DEL PROBLEMA

La actividad pecuaria, se ha vuelto un recurso económico indispensable para las zonas altoandinas de nuestro Perú, la aparición de enfermedades reproductivas como es la Neosporosis bovina está afectando la parte productiva que se pueda obtener del ganado, que es causada por el parásito *Neospora caninum* (Anderson *et al.*, 1997).

Los Provincia de Anta es conocida por ser una de las principales productoras de leche que abastecen la región del cusco, sin embargo, los productores indican que existen problemas reproductivos que afectan la producción del ganado tanto en la parte reproductiva como en lo productivo. La Neosporosis bovina es una de las causantes de abortos espontáneos entre el segundo trimestre de gestación generando grandes pérdidas al ganadero (Almeria & Lopez, 2013). Si la infección del feto no resulta en aborto, la cría puede convertirse en portador clínicamente sano y transmitirá la infección silenciosamente a las siguientes generaciones (SENASA, 2010).

En este contexto este trabajo de investigación tiene como objetivo identificar el ADN del parásito *Neospora caninum* presente en vacas de la pampa de Anta.

II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACION

2.1 OBJETIVO GENERAL

Detectar el ADN del parasito *Neospora caninum* en suero sanguíneo, en vacas con diagnostico seronegativo a la prueba de ELISA, a través de la prueba de PCR — Tiempo real en vacas de la Pampa de Anta de la Región del Cusco.

2.2 OBJETIVO ESPECIFICO

Determinar la prevalencia del ADN del parásito *Neospora caninum*, por Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RT-PCR), en vacas con diagnostico seronegativo a la prueba de ELISA; de los distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite de la Pampa de Anta — Cusco.

2.3 JUSTIFICACION

La Provincia de Anta de la región del Cusco, es conocida como una zona ganadera, dedicándose principalmente a la ganadería lechera, contando con las principales razas productoras de leche, siendo así, una de las provincias que provee leche a la empresa GLORIA S.A y a las plantas procesadoras de lácteos de la Zona, por tal razón esta actividad es el sustento económico de muchas familias de los distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite de la provincia de Anta.

La Neosporosis bovina ha sido descrita hace poco más de una década y en la actualidad es considerada como una de las principales causas de aborto y mortalidad neonatal en el ganado vacuno lechero en diversos países.

Con este trabajo de investigación se determinó la presencia del ADN del parásito del *Neospora caninum* en suero de vacas, en los distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite de la provincia de Anta. Identificándose a las vacas positivas al ADN del parásito y notificando a los productores para que se tomen las acciones.

III. MARCO TEORICO

3.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

Este estudio realizado por (Okeoma *et al.*, 2005), cuantificó el ADN de *Neospora caninum* en la sangre y el cerebro de 30 vaquillas gestantes y abortadas mediante el seguimiento de la formación de productos de PCR en tiempo real utilizando SYBR Green I, un tinte de unión al ADN de doble hebra . Se diseñaron cebadores para amplificar un producto de 188 pb específico para *N. caninum* a partir del fragmento del gen Nc-5 de *N. caninum*. De manera similar, se amplificó un producto de 71 pb a partir del gen ARNr 28S del ADN genómico bovino que sirvió como control. La electroforesis en gel de agarosa y el análisis de la curva de fusión de los productos de PCR mostraron que ambos pares de cebadores eran específicos de sus objetivos. Se generaron curvas para el ADN genómico de *Neospora caninum*, y se utilizaron para calcular la concentración relativa de parásito a ADN bovino en las muestras de prueba. La concentración de ADN de *N. caninum* en 1 ng de ADN genómico bovino obtenido de sangre osciló entre 0,097 ng en la 1ª semana de observación y 0 ng en la 15ª semana en vacas abortadas. En vacas gestantes, los valores variaron entre 0.080 ng en la primera semana y 0.155 ng en la decimoquinta semana de observación. Hubo una disminución sostenida de la concentración de ADN en el grupo abortado después del aborto y un aumento en la concentración de ADN en el grupo de embarazadas. La comparación del ADN del parásito en la sangre y el cerebro de vaquillas infectadas mostró una mayor concentración de ADN en el cerebro que en la sangre.

En el trabajo de investigación realizada por (McInnes *et al.*, 2006) utilizó una PCR anidada que detectó con éxito ADN de *Neospora caninum* en suero de ganado para la investigación de casos de aborto seleccionados y en un estudio de vacas preñadas sanas en un matadero. El ADN de *N. caninum* no se detectó en el suero de las madres

Con anticuerpos positivos que abortaron debido a *N. caninum*, pero estaba presente en el suero de algunas madres con anticuerpos negativos que abortaron debido a otras causas. El ADN de *N. caninum* también se encontró en el suero de aproximadamente la mitad de los animales que abortaron por causa indeterminada, pero no se detectó en el suero de las vacas de dos hatos de ganado de carne en Australia Occidental sin antecedentes recientes de aborto. En el estudio del matadero de 79 madres y sus fetos, se encontró ADN de *N. caninum* en el suero de 3 madres y en el material de 11 fetos. La mayoría de las vacas y todos los fetos fueron anticuerposnegativos. No existe una relación obvia entre la presencia o ausencia de ADN de *N. caninum* en suero y la presencia de anticuerpos contra *N. caninum* en madres, la presencia de ADN de *N. caninum* en fetos o el aborto debido a *N. caninum*. Este es el primer informe de detección de ADN de *N. caninum* en suero de ganado en lugar de la fracción de glóbulos blancos. Indica la presencia de taquizoítos libres y / o ADN del parásito en circulación. Los resultados sugieren que la infección persistente en ausencia de anticuerpos es un posible resultado de la infección por *N. caninum*. La infección de los fetos en ausencia de anticuerpos respalda la posibilidad de una infección persistente debido a la inmunotolerancia a una infección temprana en el útero.

En el trabajo de investigación realizado (Reyes, 2016), el objetivo fue detectar a *Neospora caninum* mediante PCR en sangre y asociar el serostatus frente al parásito con la producción láctea en bovinos de un hato perteneciente al SPLPE del municipio de Amecameca, Estado de México. Se estableció el estado serológico frente al parásito mediante ELISA al inicio del estudio y se registró la producción láctea de las hembras en producción semanalmente durante 36 meses para posteriormente comparar la exposición a *Neospora caninum* y determinar la asociación con la producción de leche.

Por otra parte, se realizaron cinco muestreos de manera mensual y se colectaron muestras sanguíneas de la vena caudal por medio de tubos al vacío con anticoagulante para la obtención glóbulos blancos con la finalidad de determinar la presencia del parásito utilizando la técnica de PCR anidado con iniciadores previamente publicados, adicionalmente, fueron analizados tejidos fetales con el mismo protocolo; fueron secuenciados amplicones obtenidos y comparados con los reportado en el Genbank; finalmente, se calculó la concordancia entre las pruebas ELISA y PCR. De 37 vacas en las que se registró la lactancia completa, el 27 % fue seropositivo en un estudio previo; estimando un promedio de producción de 3,755.1 Kg. de leche por lactancia para el grupo de vacas seropositivas y de 4,390.9 Kg para las vacas seronegativas. Se estimó una seroprevalencia del 81.8 % a *Neospora caninum* en el hato por medio de ELISA; por su parte, el porcentaje de animales positivos al parásito mediante la prueba de PCR anidado fueron de 55.8, 94.1, 100, 97.1, 100 para los meses uno al cinco, respectivamente, promediando 89.4 % en el periodo estudiado. Con respecto al tiempo de gestación, fueron positivas 13, 16, 15, 13, 14, 13, 11, 10, 6 vacas desde el primero al noveno mes respectivamente; también, resultaron positivas 41 vacas no preñadas (nueve recién paridas), siendo de 88.0, 88.9, 87.9 % las prevalencias por cada tercio de gestación. Hubo un 91-96 % de homología en las secuencias de los amplicones respecto a lo publicado.

En el estudio realizado por (Reyes et al., 2017), se evaluó la seropositividad a *Neospora caninum* mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) y se detectó el ADN por PCR anidada con iniciadores externos Np 21-4 e internos Np 9-10 en leucocitos de vacas del sistema de producción de leche en pequeña escala en Amecameca, Estado de México. Se estudió un hato con 34 hembras adultas realizando el seguimiento con muestreos sanguíneos durante cinco meses; también, se analizaron dos muestras de encéfalo de

fetos abortados y se constató la secuencia de los amplicones en el Genbank. La concordancia entre técnicas fue comparada mediante la prueba Kappa. La seroprevalencia por ELISA fue de 85.3 %; y se detectó ADN del parásito en 89.4 % de las vacas. Una muestra de encéfalo fue positiva. La similitud de los amplicones osciló entre 91 y 96 %, el índice Kappa fue de 0.41. El empleo de leucocitos aumenta la probabilidad de amplificar ADN de *N. caninum*.

Tabla 01: Resumen de Antecedentes para la detección del ADN del parásito de la *Neospora caninum*.

Autor, año y lugar	N° de animales	Muestra	Prueba	Positivos/N° animales	Positivos - porcentaje
Okeoma <i>et al.</i> , (2005).	30	Suero y cerebro	PCR	25/30	85%
MclInnes <i>et al.</i> , (2006).	79	Suero	PCR	14/79	17.72%
Reyes S. (2016).	37	Suero	PCR	33/39	89.4%
Reyes <i>et al.</i> , (2017)	34	encéfalo de feto	PCR	27/34	79.4%

3.2 BASES TEORICAS

3.2.1 *Neospora caninum*

La *Neospora caninum* es un Coccidio que afecta principalmente caninos y bovinos. La Neosporosis fue inicialmente descrita en caninos y posteriormente se postuló como causa de aborto epidémico en bovinos de leche a finales de los años 80, en Nuevo México. No obstante, sólo en 1989 se reconoció la enfermedad en los bovinos y su diseminación mundial (Vargas & Cortez, 2001). La Neosporosis bovina se caracteriza por ser típicamente asintomática y de transmisión congénita por lo que las hembras infectadas perpetúan el parasitismo de generación en generación, en las

explotaciones ganaderas. En los casos en donde se presenta sintomatología clínica la principal manifestación es el aborto con las consecuentes pérdidas económicas por la reducción en la producción de leche, la muerte de neonatos y la pérdida de animales adultos (Barr *et al.*, 1995; Lindsay *et al.*, 1996).

La Neosporosis es principalmente una enfermedad del ganado vacuno; perros y cánidos relacionados son los hospedadores definitivos del *Neospora caninum*, mientras que la toxoplasmosis es principalmente una enfermedad de los seres humanos, ovejas y cabras; félidos son los únicos hospedadores definitivos de *Toxoplasma gondii* (MacAllister *et al.*, 1998).

Aunque se han notificado anticuerpos frente a *Neospora caninum* en suero de humanos, el propio parásito no se ha detectado en tejidos humanos. Por lo tanto, el potencial zoonótico del parásito es incierto (Tranas *et al.*, 1999).

3.2.2 Historia

La aparición de la *Neospora caninum* se relata por (Bjerkas, 1984) en Noruega, en cachorros que presentaban alteraciones neuromusculares; en esa ocasión fue considerado como *Toxoplasma gondii*, aunque el estudio serológico no fue positivo para este agente. Posteriormente, tejidos de perros con diagnóstico presuntivo de toxoplasmosis fueron estudiados por (Dubey, 1988) donde observaron la presencia de un parásito diferente a *Toxoplasma gondii*, describiendo el nuevo género como *Neospora* y la especie *caninum*, se elaboraron la inmunofluorescencia indirecta como primera prueba para diagnóstico serológico de *Neospora caninum*. Igualmente, (Thilsted & Dubey, 1989), reportaron por primera vez la presencia de organismos semejantes al *Neospora caninum* en cerebros de fetos bovinos abortados de un rebaño lechero en Nuevo México, el cual presentaba abortos frecuentes (Wouda, 1998).

En el año de 1991 fue considerada como la mayor causa de abortos bovinos en el Estado de California. Asimismo; (Conrad *et al.*, 1993) logran reproducir la enfermedad al inocular taquizoitos en bovinos en forma experimental. Desde el punto de vista diagnóstico el mismo Bjerkas reportó que las cepas aisladas en caninos son idénticas a las aisladas en bovinos. Con este hallazgo y el desarrollo de técnicas de diagnóstico inmunohistoquímico y de ELISA se amplían las herramientas (Aycachi, 2005).

3.2.3 Agente etiológico

a.- Taxonomía y estructura

La *Neospora Caninum*, es un protozoo intracelular obligado crea una vacuola parasitófora donde se ubica, es formador de quistes tisulares y su ciclo es indirecto; afecta a las principales especies de ganado doméstico, animales de compañía y a algunos animales salvaje (Radostis *et al.*, 2002). Según su clasificación taxonómica pertenece a:

- Reino : Protista
- Subreino : Protozoo
- Phylum : Apicomplexa
- Clase : Esporozoa
- Orden : Eucoccoccida
- Familia : Sarcocystidae
- Subfamilia : Toxoplasmatinae
- Género : *Neospora*
- Especie : *Caninum*

La característica ultra estructural más relevante del *Neospora Caninum* es la presencia del complejo apical que se encuentra en la punta del protozoo, se encuentra conformado por el conoide (microtúbulos en espiral), las roptrias (un cuerpo secretor) y el anillo polar (una o más bandas de microtúbulos).

También puede poseer micronemas (vesículas secretoras) que se encuentran rodeadas por uno o dos anillos polares. Este complejo apical es quien le permite al protozoo la entrada a la célula mediante la acción perforante del conoide y las secreciones químicas de las roptrias. El protozoo también cuenta con gránulos densos ubicados a su alrededor, que ejercen su acción luego de penetrar la célula, éste cuenta con unas vesículas llamadas alvéolos corticales en donde se apoya la membrana de la célula generando una estructura semirrígida excepto en el microporo (espacio por donde se alimenta y produce los ooquistes (Mcallister *et al.*, 2000).

Los gametos cuentan con flagelos los cuales están dispuestos en la parte posterior, su número varia pudiéndose presentar de uno a tres, esto les permite deslizarse mediante adherencias y motores estáticos de miosina, pudiendo así atravesar diferentes tejidos, entrar y salir de la célula huésped (Calandra, 2014).

3.2.4 Estadios parasitarios

En el ciclo de *Neospora caninum*, son reconocidos los siguientes estadios parasitarios:

Tabla 02: Estadios parasitarios del parásito de la *Neospora caninum*.

Estadio	Ubicación
Taquiozito	Huésped intermediario
Bradizoito	Huésped intermediario (quiste tisulares)
Esporozoito	Huésped definitivo.

Fuente: Escalona. (2010).

a.- Taquizoitos

Los taquizoitos se encuentran en el huésped intermediario, este es el estado en el cual se multiplica, miden 3 a 7 μm de largo por 1 a 5 μm de ancho. Tienen forma de media luna o globular, se multiplican mediante endodiogenia dentro de vacuolas parasitóforas y rompen la célula para dirigirse a invadir otras células del organismo mediante el mismo proceso (Aycachi, 2005).

Estos taquizoitos, se pueden encontrar en neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miositos, células renales y hepatocitos. Tanto los taquizoitos como los bradizoítos, se encuentran localizados principalmente en el feto, la placenta y el tejido nervioso de la madre (Oviedo *et al.*, 2006).

b.- Bradizoitos – quistes tisulares

Los bradizoitos poseen una replicación más lenta que los taquizoitos, su división es mediante endodiogenesis y están contenidos en quistes tisulares, de forma redonda u oval miden de 20 a 107 μm con una pared de 4 μm lisa y gruesa. Así mismo, los bradizoítos miden 6 μm a 8 μm de largo x 1 a 1.8 μm de ancho, los quistes tisulares, se pueden hallar en el tejido nervioso y muscular (Fort, 2003).

c.- Esporozoito

Los esporozoitos no esporulados, son eliminados al medio ambiente por el hospedador definitivo, esporulan luego de tres días formando en su interior dos esporocitos cada uno con cuatro esporozoítos, siendo esta la forma infectante para los hospedadores intermediarios (Echaide, 2000).

3.2.5 Ciclo de vida

El *Neospora Caninum* comprende un ciclo biológico indirecto, es decir requiere de hospedadores intermediarios y definitivos que favorecen su diseminación (Martínez *et al.*, 2012). Se ha definido a diferentes animales domésticos como hospedadores

Intermediarios entre ellos los caninos, bovinos, ovinos, caprinos, búfalos y animales silvestres como lobos, coyotes, zorros, ciervos y alces (Cebrian *et al.*, 2003).

Los hospedadores definitivos de *Neospora Caninum* son el perro (*Canis familiaris*), el coyote (*Canis latrans*), el dingo australiano (*Canis lupus dingo*) y el lobo gris (*Canis lupus lupus*). Estos animales adquieren la infección al consumir tejidos con quistes tisulares de hospedadores intermediarios, y posteriormente liberarán ooquistes al medio ambiente a través de las heces (Calandra, 2014). En el hospedador intermedio, se lleva a cabo la reproducción asexual (merogonia), posteriormente de que estos animales consumen agua o alimentos contaminados con ooquistes esporulados provenientes de materia fecal de hospedadores definitivos (perros principalmente). Por lo anterior, se puede indicar que la mayoría de las infecciones se llevan a cabo en épocas de lluvia, ya que la viabilidad de los ooquistes disminuye en época seca, se debe tener presente que sólo son necesarios 300 ooquistes esporulados para infectar una ternera (Ford, 2003).

En el hospedador definitivo, los jugos gástricos se encargan de degradar el quiste liberando así los estadios parasitarios que iniciarán el ciclo enteroepitelial, allí en el intestino, se realiza una fase de reproducción sexual (gametogonia) para eliminar los ooquistes no esporulados al medio ambiente 8 o 14 días post infección en las heces del hospedador definitivo (Moore, 2005).

Posteriormente, los ooquistes liberan los esporozoitos en el tracto gastrointestinal penetrando las células entéricas para transformarse en taquizoitos los cuales se dividen rápidamente en la célula mediante endodiogenia rompiendo la misma, produciendo de esta manera daño tisular y diseminando la infección a otros tejidos mediante la vía sanguínea y linfática; los taquizoitos pueden continuar con su división o diferenciarse a bradizoitos y formar quistes tisulares. Tanto los taquizoitos

como los bradizoitos, van a localizarse en el feto, la placenta y el sistema nervioso central de la madre, aun así, los taquizoitos muestran un mayor tropismo hacia el sistema nervioso central, sistema musculo esquelético y cardiaco, células endoteliales y placenta. Los quistes tisulares y los bradizoitos, son resistentes a las soluciones ácidas de pepsina indicando la importancia de los carnívoros en su ciclo de vida (Escalona, 2010).

Los caninos que consumen los tejidos infectados eliminan ooquistes manteniendo así su condición de seronegativos, por otro lado, cuando el perro actúa como hospedador intermediario puede ser seropositivo y transmitir de esta forma la infección verticalmente a sus cachorros, también puede desarrollar la enfermedad presentando signos clínicos como parálisis, miositis y dermatitis (Bearden & Fuquay, 1982).

3.2.6 Vías de transmisión

La transmisión de la infección se realiza mediante dos formas: vertical o congénita (endógena) y horizontal (exógena). En la primera, la madre infecta el feto a través de la placenta, se presenta en el hospedador intermediario ya sea carnívoro o herbívoro y frecuentemente se describe en los bovinos y en el perro. En la segunda, el hospedador intermediario debe consumir alimento o agua contaminados con ooquistes esporulados provenientes de heces del hospedador definitivo (Santana *et al.*, 2010).

La *Neospora caninum* también puede ser eliminado por toros en el semen ya que se ha establecido su ADN en muestras de semen congelado, aun así, la infección venérea sería poco probable ya que este se comporta como hospedador intermediario sin tener la posibilidad de eliminar las formas infectivas, sin embargo,

hasta el momento la posibilidad no ha sido debidamente investigada (Moore *et al.*, 2005).

a. Transmisión vertical

La transmisión vertical es la forma más frecuente de infección en los bovinos a nivel mundial, en diversas investigaciones se ha demostrado que la transmisión transplacentaria es la ruta más dominante de infección, ya que un 75-95% de terneras nacidas de vacas infectadas, nacen infectadas. (Radostitis *et al.*, 2002).

Luego del ingreso del protozoo por vía oral en una hembra bovina o posterior a la reactivación de quistes tisulares que se encontraban en latencia y que fueron adquiridos congénitamente, los parásitos viajan por el torrente sanguíneo alcanzan la placenta y acceden al feto lo cual puede producir abortos (fetos autolizados, momificaciones fetales y mortinatos), en el caso contrario, se puede dar el nacimiento de un ternero congénitamente infectado y clínicamente sano (Martínez *et al.*, 2012).

La inmunidad natural desarrollada por los animales, resulta ser ineficiente para prevenir la transmisión vertical, ya que al ser un parásito intracelular obligado se espera que sea la inmunidad mediada por células las que generen una protección frente al agente (Santana *et al.*, 2010)

b. Transmisión horizontal

Siendo el perro el hospedador definitivo más importante en el medio lo convierte en el principal difusor de la enfermedad al contaminar con heces el agua y las pasturas de los bovinos quienes adquieren por vial oral el parásito (Valenzuela, 2005).

La posibilidad de tener la transmisión horizontal y vertical, ayuda a comprender la alta prevalencia y distribución que posee *Neospora caninum* ya que el perro cuenta con una distribución mundial, de esta forma se ha reportado que los perros que viven en los hatos ganaderos tienen prevalencias más altas de anticuerpos contra

Neospora caninum que aquellos animales que viven en áreas urbanas, por lo tanto, la exposición es alta (Aycachi, 2005).

3.2.7 Patogénesis

El desarrollo de esta enfermedad, dependerá en gran parte del equilibrio existente entre la capacidad del taquizoito para ingresar en los tejidos y la respuesta del hospedador para evitar la proliferación del parásito (Radostitis, 2002). Luego de que los taquizoitos se encuentren en el organismo pueden atacar cualquier órgano del animal, mostrando una predilección por células del SNC, musculares-esqueléticas, cardíacas y endoteliales. Una vez en los tejidos, inicia su multiplicación por endodiogenia lo que genera la destrucción de las células produciendo necrosis focales y respuestas inflamatorias no purulentas compuestas por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, siendo estas las principales lesiones de la enfermedad; de esta forma, la multiplicación también puede generar la formación de quistes tisulares que podrán estar presentes durante toda la vida del animal (Dubey & Schares, 2006).

La *Neospora caninum* posee tropismo por los vasos sanguíneos de la placenta y el epitelio corio fetal, lo que genera una vasculitis, inflamación y degeneración con necrosis difusa del lecho placentario (Youngquist *et al.*, 2007).

La activación de quistes tisulares de una infección latente está asociado a un importante mecanismo de transmisión vertical más que aun proceso que tenga como consecuencia el aborto (Moore *et al.*, 2005).

Los diferentes mecanismos hormonales e inmunes de la madre durante la gestación, así como el desarrollo del sistema inmune del feto, determinarán si la infección producirá la muerte fetal, el nacimiento de un animal congénitamente infectado o libre de la infección; se estima que existe un tiempo entre tres a cuatro semanas entre la infección fetal y el aborto (Moore *et al.*, 2005).

3.2.8 Signos clínicos

Las novillas y vacas infectadas son aparentemente sanas, el único signo presente es el desenlace de abortos que ocurren entre el segundo y último tercio de la gestación siendo más común entre el quinto y sexto mes. Posterior al aborto, se ha reportado que los animales clínicamente se observan normales sin presencia de retención de placenta ni endometritis, lo que indica una involución uterina (Guy, 2005). Aunque no es un signo patognomónico, los fetos abortados se hallan principalmente momificados, también se pueden encontrar autolizados y mortinatos. Aun así se debe tener presente que la infección fetal no siempre conlleva a la muerte, pudiendo nacer terneros infectados y desarrollar signos clínicos a partir del tercer día de nacimiento, se pueden evidenciar problemas nerviosos como ataxia, parálisis, flexión o hiperextensión de miembros anteriores y posteriores, en algunos casos se puede presentar exoftalmia o asimetría ocular y posteriormente la muerte, otra opción que se puede dar, es la de terneros clínicamente sanos pero congénitamente infectados de los cuales mueren alrededor del 5% (Martínez *et al.*, 2012); son estos últimos animales quienes adquieren gran importancia dentro del hato ya que es considerado que las hijas de vacas serológicamente positivas a *Neospora* continuarán siendo siempre positivas, así es esta la principal forma de perpetuar la enfermedad en un hato (Jiménez, 2012).

En la histopatología del feto abortado (imagen 6), se pueden observar lesiones microscópicas en órganos como el cerebro, médula, hígado y corazón, en algunas ocasiones se pueden ver lesiones en riñones y pulmones las cuales consisten en encefalitis multifocal necrotizante no supurativa, miocarditis e hidropericardio; el parásito tiene tropismo por los vasos sanguíneos de la placenta y el epitelio corio-fetal, generando así vasculitis, inflamación y degeneración del corion con degeneración

difusa de la placenta, las únicas lesiones macroscópicas que pueden ser observadas es la autólisis fetal (Fredes, 2003; Radostis *et al.*, 2002).

Los animales seropositivos frente a *Neospora caninum*, son más propensos a sufrir de abortos frente a aquellos animales seronegativos, los abortos pueden incluso ocurrir varias veces consecutivamente (Rosenberger, 2005).

3.2.9 Gestación e inmunidad frente al *Neospora caninum*

La gestación es un proceso que comprende diversos mecanismos de aceptación y rechazo, durante esta etapa la madre genera adaptaciones tanto a su metabolismo como al sistema inmune con el fin de generar un ambiente nutritivo y de homeostasis para así favorecer el desarrollo del embrión y posteriormente del feto. Sin embargo, estos mecanismos se pueden ver afectados por diferentes factores como el estrés y la presencia de agentes patógenos que producen abortos (Fredes, 2003).

La respuesta inmune generada en las infecciones parasitarias depende del tipo de parásito, de este modo, los parásitos extracelulares se encargan de estimular una respuesta mediada por linfocitos helper tipo 2 (Th2), con la producción de interleuquinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13), inmunoglobulina G1 (IgG1) e inmunoglobulina E (IgE); por otra parte los parásitos intracelulares como *Neospora caninum* estimulan una respuesta mediada por linfocitos helper tipo 1 (Th1) dominada por la producción IL-12, interferón Gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral alfa (FNT α) e IgG2, las cuales se encargan de activar vías que generan radicales libres y óxido nítrico (ON) siendo letales para estos parásitos (Valenzuela, 2005).

La respuesta inmune Th2, es favorecida por los altos niveles de progesterona y se encarga de mantener la preñez a través de la producción de IL4, IL5, IL6, IL9 e IL10,

así mismo disminuye la producción de moléculas proinflamatorias como IL12 e IFN- γ , siendo estas últimas perjudiciales para la vida fetal (Radostis *et al.*, 2002).

Las IL-2, IL-3, y IL-12, promueven la actividad citolítica en macrófagos y células natural killer (NK) de igual forma, activan la protrombina facilitando la coagulación y la trombosis, al mismo tiempo son capaces de estimular la producción de inmunoglobulinas que se encargan de activar la cascada del complemento (Guy *et al.*, 2001).

Uno de los mecanismos más importantes durante el proceso de rechazo fetal establece un desequilibrio entre la respuesta Th1/Th2 a favor de la respuesta Th1 alterando el sincitiotrofoblasto, por consiguiente, se genera la producción de IFN- γ que es capaz de interferir sobre ese tejido directamente causando abortos espontáneos, y otras citoquinas asociadas a este tipo de respuesta (Innes *et al.*, 2002).

De acuerdo a lo anterior, se debe tener presente los mecanismos existentes mediante los cuales es activada la respuesta inmune.

a. Inmunidad humoral

Este tipo de inmunidad determina la producción de inmunoglobulinas, una respuesta celular Th1 estimula la producción de IgG2, así por el contrario una respuesta celular Th2 genera la producción de IgG1 mediante la secreción de IL-4. Se cree que la generación de anticuerpos específicos limita el grado de infección o facilita la lisis de los taquizoitos extracelulares (Innes *et al.*, 2002).

b. Inmunidad celular

La inmunidad mediada por células es de gran importancia durante las infecciones por *Neospora caninum*, al observar que la respuesta generada es principalmente de tipo Th1 los cuales son activados por epítopes que se expresan en la superficie de células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas),

Estando asociadas a moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase II, promoviendo de esta manera la respuesta citolítica y la inmunidad celular mediada por anticuerpos; de igual forma al momento de ser procesadas las proteínas antigénicas en el interior de las células, los epítopes también son presentados a los linfocitos citotóxicos (Lc) asociados a moléculas del CMH I (Innes *et al.*, 2002).

El hecho de hallar anticuerpos específicos contra *Neospora caninum* en el suero fetal o en el suero precalostrado de los terneros confirma la infección, sin embargo, la obtención de un resultado negativo no significa que el feto no haya adquirido la infección, esto se debe a que la síntesis de anticuerpos del feto depende del tiempo de gestación, el nivel de exposición y el tiempo que haya transcurrido entre la infección y el aborto. Otro motivo por el cual puede fallar la detección de anticuerpos se debe a la autólisis fetal, la cual genera una degradación de las inmunoglobulinas generando así bajos niveles de anticuerpos específicos (Valenzuela, 2005).

3.2.10 Diagnóstico

El diagnóstico de la Neosporosis bovina se hace complejo debido a la falta de signos clínicos patognomónicos y a su fácil asociación con otro tipo de enfermedades que generan problemas reproductivos entre ellos el aborto (Echaide, 2000). Sin embargo, se hace indispensable asociar la anamnesis, el estado sanitario de la explotación, la presentación de signos clínicos y lesiones halladas, aun así, el diagnóstico final que confirmará la presencia de la enfermedad será dado por pruebas que identifiquen antígenos o anticuerpos contra *Neospora Caninum* (Cebrián *et al.*, 2003).

Actualmente las pruebas más utilizadas para realizar el diagnóstico son por medio de histopatología, pruebas serológicas (inmunofluorescencia indirecta IFI, Elisa

indirecta) y PCR, de esta forma los resultados indican el grado de infección que presenta un hato ganadero y de sus posibilidades de sufrir abortos por dicha enfermedad (Santana *et al.*, 2010).

El diagnóstico realizado mediante histopatología se dificulta debido a la similitud que posee *Neospora caninum* con *Toxoplasma Gondii* y *Sarcocystis spp*, por tal motivo los cerebros de fetos que se encuentren momificados o autolizados y que por esto no permitan el estudio histopatológico convencional podrán ser evaluados mediante PCR (Santana *et al.*, 2010).

3.2.11 Neosporosis Bovina

La Neosporosis bovina es una parasitosis, producida por el *Neospora caninum* generalmente causa aborto, mortalidad en el embrión, disminución en la producción de leche, incrementa la tasa de desecho (Trees *et al.*, 1999), nacimientos de terneros con anomalías congénitas y disminución en la tasa de crecimiento de terneros (Barling *et al.*, 2000).

3.2.12 Prevalencia

La prevalencia serológica, varía dependiendo del país, región, el tipo de prueba utilizada y el corte que determina los niveles de exposición. El parásito se encuentra en todo el mundo. El índice de prevalencia de aborto es similar a las vacas estabuladas (california), como en condiciones de pastoreo (Dubey, 2003).

Mundialmente las prevalencias reportadas en vacas de lechería están entre 12 % y 42% (Dubey, 2003), se disponen de datos de seroprevalencia individual de *Neospora caninum*.

3.2.13 Patogénesis del aborto

El aborto se produce generalmente en vacas seropositivas, las vacas seropositivas tienen mayor probabilidad de abortar que las seronegativas. Existe un

aumento de los títulos de anticuerpos, en el 4 – 5 mes de gestación y antes del parto por un mecanismo de reactivación de una infección latente (Dubey, 2003).

La infección de una vaca preñada, puede reactivarse por influencias hormonales e inmunológicas, originando una parasitemia, el medio ambiente hormonal de la hembra gestante, favorece la reactivación y transmisión vertical del parásito al feto, motivado probablemente por un descenso de la progesterona y aumento relativo de los estrógenos durante la gestación (Innes *et al.*, 2002).

3.2.14 Genoma

El genoma es el conjunto de genes contenidos en los cromosomas, lo que puede interpretarse como la totalidad del material genético que posee un organismo o una especie en particular (Winkler, 1920).

3.2.15 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR en tiempo real, también denominada PCR cuantitativa o qPCR, puede proporcionar un método sencillo y elegante para determinar la cantidad de una secuencia o gen objetivo que está presente en una muestra. Las reacciones se caracterizan por el punto en el tiempo durante el ciclo cuando se detecta por primera vez la amplificación de un objetivo en lugar de la cantidad de objetivo acumulada después de un número fijo de ciclos. Cuanto mayor es el número de copias iniciales de la diana de ácido nucleico se observa un aumento significativo en la fluorescencia. Por el contrario, un ensayo de punto final (también llamado "ensayo de lectura de placa") mide la cantidad de producto de PCR acumulado al final del ciclo de PCR. (ThermoFisher scientific).

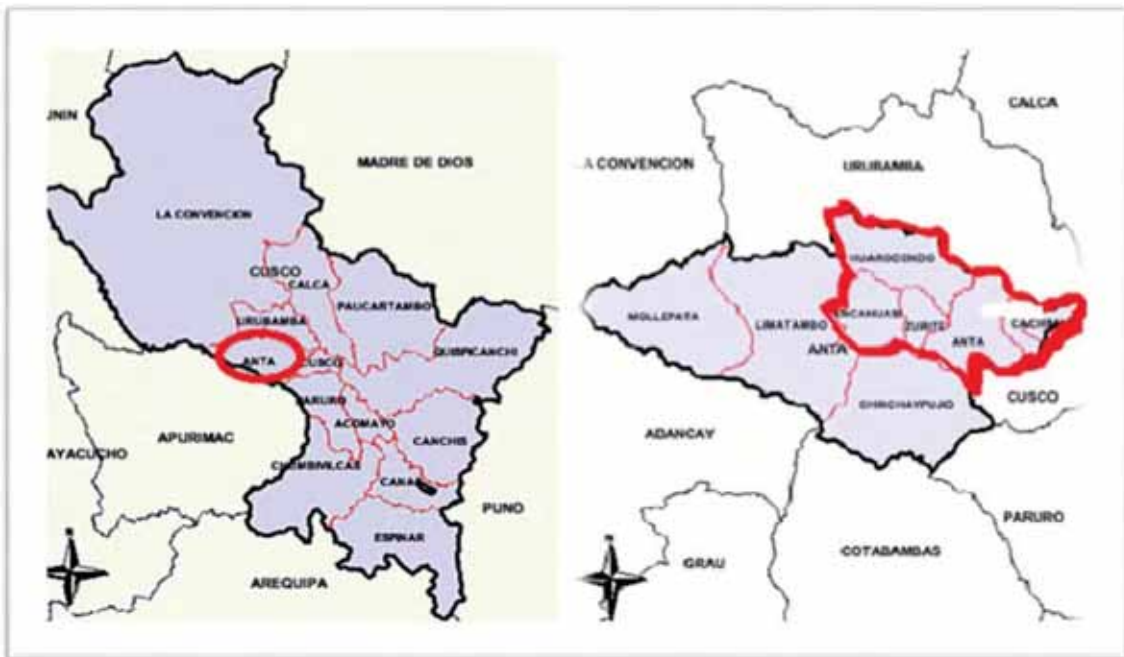
IV. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

4.1 ÁMBITO DE ESTUDIO

El presente trabajo de investigación se realizó en vacas de los Distritos de Ancahuasi, Anta, Zurite, Huarcocondo y Cachimayo de la Provincia de Anta, Región Cusco.

El procesamiento de las muestras seronegativas al parásito de la *Neospora caninum* se realizó en el laboratorio de Sanidad animal “M.V. Atilio Pacheco Pacheco”; en el área de biología molecular y celular de la Escuela profesional de Zootecnia, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, en el periodo de octubre a diciembre del 2019.

Figura 01: Mapa geográfico Anta y sus distritos.



Fuente: Instituto Geográfico Nacional (IGN).

4.1.1 Ubicación política

- Región : Cusco
- Provincia : Anta
- Distrito : Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite

4.1.2 Ubicación geográfica

- Latitud Sur : 13°25'20"
- Latitud Norte : 13°29'24"
- Longitud Norte : 72°13'00"
- Longitud Este : 72°22'12"
- Altitud máxima : 5 850 m s.n.m
- Altitud mínima : 1 700 m s.n.m
- Superficie : 2 414,29 km²

Fuente: SENAMHI, 2010

4.1.3 Clima

El clima de la zona es frío-templado debido a su altitud; con una temperatura que oscila entre 1°C a 19°C, caracterizado por un contraste muy fuerte entre una estación de lluvia y una estación de seca: hay presencia lluvia entre los meses de noviembre a marzo que termina en abril y una estación seca entre los meses de noviembre a marzo, con heladas nocturnas desde fines de mayo hasta principios de agosto. La precipitación anual esta entre 650 mm de diciembre a marzo y 150 mm entre abril y noviembre en las principales zonas de vida (3600 m.s.n.m). El déficit hídrico permanece nueve meses de abril a Diciembre (SENAMHI, 2010).

4.2 MATERIALES DE ESTUDIO

4.2.1 Población

El universo estuvo conformado por vacas de la pampa de Anta.

4.2.2 Muestra

Las muestras estuvieron constituidas de suero sanguíneo de vacas seronegativas a la prueba de *Neospora caninum* por el método ELISA.

4.2.3 Tamaño de muestra

El tamaño de muestra fue determinado teniendo en cuenta un nivel de confianza del 91 % y error de precisión de 0.09, mediante el método no paramétrico de muestreo simple al azar. Considerando una población conocida base de 927 vacas seronegativas a la prueba de *Neospora caninum* por el método ELISA, de los distritos de Ancahuasi, Anta, Huarcocondo, Zurite y Cachimayo de la Provincia de Anta.

$$N = \frac{N * Z^2 * p * q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 * (p * q)}$$

Dónde:

N: Tamaño poblacional.

Z: 1.7, nivel de confianza que se da a la muestra.

p: animales positivos a *Neospora caninum*.

q: animales negativos a *Neospora caninum*.

E: error experimental 0.09

Tabla 03: Distribución de muestras de suero sanguíneo de vacunos seronegativos a *Neospora caninum*.

Distrito	N° de muestras
Cachimayo	14
Anta	16
Ancahuasi	18
Huarocondo	13
Zurite	19
Total	80

4.2.4 Instrumentos y equipos para el procesamiento de muestras

- Micro Centrifuga.
- Vortex.
- Cabina de flujo laminar (Kossodo).
- Equipo de PCR - RT (Applied Biosystems).
- Lector multimodal con capturas de imágenes celulares - CYtation 5.
- Micropipetas de (1 - 20 µl; 20 – 200 µl y 100 - 1000 µl).
- Rack Magnético.

4.2.5 Materiales para el procesamiento de muestras

- Tips desechables y esterilizados.
- Viales criogénicos de 2.5 ml y 5 ml.
- Barbijos.
- Gorros.
- Lentes.
- Guantes de látex.
- Mandiles descartables.

- Cronometro.
- Multi portador de tubo para el vortex.
- Tubos de reacción rápida (8 tubos/tira).
- Tapa de tubos de reacción rápida (8).

4.2.6 reactivos y tipo de muestra para el análisis del ADN del Neospora caninum

a.- Kit de PCR - RT para detectar el ADN del parasito de la *Neospora caninum*.

- N.caninum specific primer/probe mix (150 reactions MARRON).
- N.caninum positive control template (for Standard curve ROJO).
- RNase/DNase free water (BLANCO).

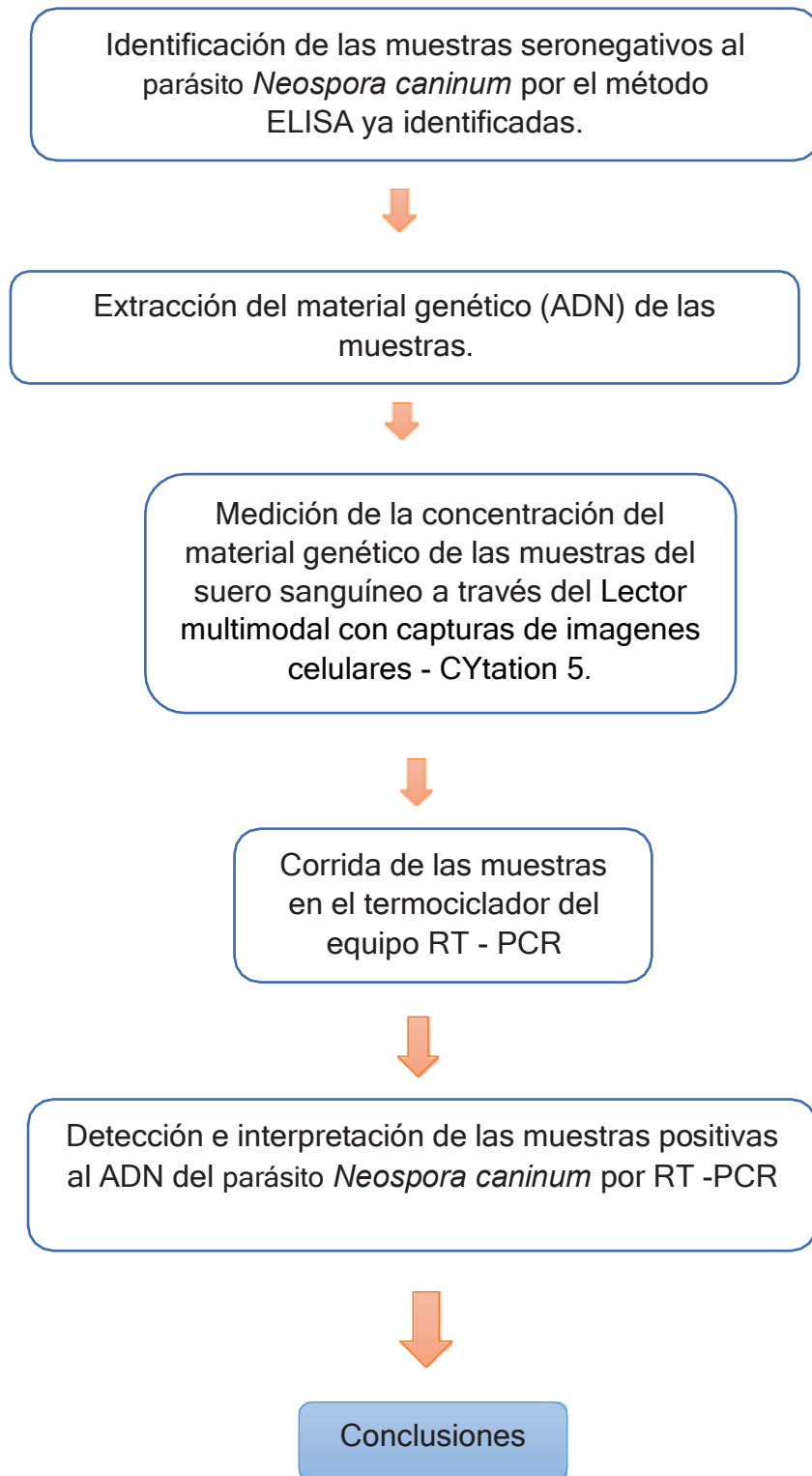
b.- Kit extractor de ADN.

- MagMAX™ CORE Lysis Solution.
- MagMAX™ CORE Binding Solution.
- MagMAX™ CORE Wash Solution 1.
- MagMAX™ CORE Wash Solution 2.
- MagMAX™ CORE Elution Buffer.
- MagMAX™ CORE Magnetic Beads.
- MagMAX™ CORE Proteinase K.

c.- Suero sanguíneo 200 µl de cada muestra.

4.3 METODOLOGÍA DE LABORATORIO

Gráfico 1: Flujograma de trabajo de investigación para la detección del ADN de la *Neospora caninum*.



4.4 METODOLOGÍA DE RT - PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL ADN DEL PARÁSITO *Neospora caninum* EN SUERO SANGUÍNEO.

4.4.1 Principios de la prueba

El Kit genesig Primerdesign está diseñado para la cuantificación y detección in vitro del ADN de *Neospora caninum*. El kit está diseñado para tener un amplio perfil de detección.

4.4.2 Extracción del material genético.

a.- Preparación de los reactivos.

- Esterilizar la cabina de flujo laminar para evitar la contaminación de las muestras.
- Descongelar las muestras y homogenizar.
- Realizar los cálculos para la cantidad de muestras a trabajar, siempre incluir el 10% de excedente para compensar la imprecisión del pipeteo.

Tabla 04: Cantidad de reactivo por reacción para las soluciones a utilizar.

Reactivo	Cantidad x muestra (µl.)	Cantidad x muestra+10% (µl.)	Cantidad x 80 muestras (µl.)
MagMAX CORE Lisis	350	385	30 800
MagMAX CORE Binding	350	385	30 800
MagMAX CORE Perlas magnéticas	20	22	1760
MagMAXCORE	10	11	880
Proteinasa k			

b.- Procedimiento para la extracción del material genético (genesigPrimerdesign).

1. En un vial criogénico marcar LU (solución de lisis unión), mezclar 385 μL de MagMAX™ CORE Lysis Solution y 385 μL de MagMAX™ CORE Binding Solution (por cada muestra).
2. En un vial criogénico marcar PM (solución de perlas magnéticas), mezclar 22 μL de MagMAX™ CORE Magnetic Beads y 11 μL de MagMAX™ CORE Proteinasa K (por cada muestra).
3. Rotular los viales criogénicos con los números de las muestras correspondientes.
4. Anadir 30 μL . De la solución de perlas magnéticas/proteinasa k a cada vial criogénico.
5. Anadir 200 μL . De Suero sanguíneo de cada muestra a cada vial criogénico.
6. Mezclar mediante pipeteo los componentes añadidos a cada vial criogénico e incubar por 2 minutos a T° ambiente.
7. Añadir 700 μL . De solución lisis/unión a cada vial criogénico.
 - a. Usar un vortex, agitar a una velocidad moderada por 3 minutos.
 - b. Usar un rack magnético, capturar las perlas. El tiempo de captura es de 1 a 3 minutos.
 - c. Cuidadosamente aspirar y descartar todo el sobrenadante sin remover las perlas.
 - d. Retirar los tubos del rack magnético.
8. Lavado de las perlas magnéticas con MagMAX™ CORE Wash Solution
 - a. Adicionar 500 μL de MagMAX™ CORE Wash Solution 1 a cada

Tubo.

- b. Usando un vortex, agitar a una velocidad moderada por 1 minuto.
- c. Usar un rack magnético para capturar las perlas. El tiempo de captura es de aproximadamente 1 minuto. Cuidadosamente aspirar y descartar todo el sobrenadante sin remover las perlas.
- d. Retirar los tubos del rack magnético.

9. Lavado de las perlas con MagMAX™ CORE Wash Solution 2.

- a. Adicionar 500 µL de MagMAX™ CORE Wash Solution 2 a cada tubo.
- b. Usar un vortex, agitar a una velocidad moderada por 1 minuto.
- c. Usar un rack magnético para capturar las perlas. El tiempo de captura es de aproximadamente 1 minuto, cuando la muestra se torne transparente, las perlas habrán sido capturadas.
- d. Cuidadosamente aspire y descarte todo el sobrenadante sin remover las perlas.
- e. Retirar los tubos del rack magnético.

10. Secado de las perlas.

- a. Dejar el tubo abierto a temperatura ambiente durante 2 minutos para que el alcohol restante de MagMAX™ CORE Wash Solution 2 se evapore.
- b. Inspeccionar el tubo, si hay solución residual quitar con una pipeta, dejar el tubo abierto en el rack magnético por otro minuto.

11. Elución de ácidos nucleicos.

- a. Dejar el tubo abierto a temperatura ambiente durante 2 minutos para permitir que el alcohol restante de MagMAX™ Wash

Solution 2 se evapore.

- b. Adicionar 90 μ L de MagMAX™ CORE Elution Buffer pre calentado a 65°C a cada tubo.
- c. Usar un vortex, agite vigorosamente durante 3 minutos, la muestra debe tornarse marrón, indicando la completa suspensión de las perlas.
- d. Usar un rack magnético capture las perlas, la captura de tardar aproximadamente 2 minutos.
- e. Tener cuidado de no remover las perlas, transferir 90 μ L de sobrenadante a un vial criogénico estéril. No desechar el sobrenadante; los ácidos nucleicos purificados están en el sobrenadante.

4.4.3 Identificación del ADN del parásito *Neospora caninum* en suero sanguíneo por RT – PCR (genesig Primerdesign).

a.- Preparación de las muestras y reactivos

1. Esterilizar la cabina de flujo laminar de trabajo durante 15 minutos.
2. Girar cada reactivo en una centrifuga antes de abrirlo.
3. Reconstituir los componentes del kit con agua libre de nucleasas.

Tabla 05: Cantidad de agua libre de nucleasas para la reconstitución de los componentes del kit.

Reactivos	Volumen de agua libre de Nucleasas(μl)
Oasig lyophilised 2x q.PCR Mastermix	165
<i>N. Caninum</i> especifica mezcla de cebador/sonda	165
Plantilla de control position <i>N. caninum</i>	165

b.- Procedimiento para la identificación del ADN del parasito *Neospora caninum* en suero sanguíneo por el método de TR-PCR.

Los pasos del pipeteo deben realizarse en hielo.

1. Para cada muestra de ADN preparar una mezcla de reacción de acuerdo a la tabla 06 (para los controles).

Tabla 06: Cantidad de reactivos para la preparación de la mezcla Master mix.

Reactivo	Volumen/muestra (μL)	Volumen/80muestras (μL)
2x q.PCR MasterMix	10	800
primer/probe - cebador	1	80
RNAse/DNAse free water	4	320
Volumen final	15	1200

2. Pipetear 15 μ L de esta mezcla (master mix) en cada pocillo de acuerdo con su configuración de placa experimental de PCR en tiempo real.
3. Pipetear 5 μ L. de control positivo y control negativo en el pocillo de acuerdo a la configuración de placa experimental.
4. Pipetear 5 μ L de ADN de las muestras a evaluar sin diluir en cada pocillo de acuerdo con la configuración de su placa experimental. El volumen final será 20 μ L por pocillo.
5. Configurar el software del PCR-RT del equipo Applied biosystems, considerando los parámetros y tiempos para la amplificación.

Tabla 07: Tiempos y temperaturas para la amplificación del PCR en tiempo real.

Proceso	Ciclos	Tiempo x ciclo	Temperatura °C
Transcripción inversa	1	10 min	42
Activación enzimática	1	2 min	95
Desnaturalización	50	10 seg	95
Colección de datos	50	60 seg	60

Gráfico 2: Flujograma de la extracción del material genético del suero sanguíneo.



Gráfico 3: Flujo de identificación del ADN del parásito *Neospora caninum* por RT

– PCR.

01. Centrifugar todos los reactivos a utilizar del kit de *Neospora caninum* estándar.



02. Añadir 10 ul de Mastermix a cada pocillo.



03. Añadir 1 ul. De primer/probe a cada pocillo, seguidamente añadir 4 ul de agua pura libre de RNA/DNA.



06: Empezar la Corrida de las amplificación para mismas debido a la concentración del ADN.



05: Configurar la plantilla del experimento que se realizara en el equipo del RT – PCR y colocar las muestras al equipo de acuerdo a la configuración que se hizo.



04. Añadir 5 ul. de control positivo al pocillo que será nuestro control positivo para nuestra prueba, igualmente añadir 5 ul. de agua libre de RNA/DNA al pocillo que será el control negativo y finalmente añadir 5ul. del ADN extraído anteriormente para cada muestra y rotular en la tapa para su identificación de cada pocillo.



4.5 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se considera como positivo a las muestras cuyo valor de Ct (ciclo umbral) sean menores de 38, como negativo a las muestras que no presentaron señal por ende no tienen Ct y es sospechoso cuando el valor del Ct, muestra valores (≥ 38 y < 40), dichas muestras tendrán que volver a ser evaluadas. (Tabla 08)

Tabla 08: Interpretación de los resultados de las pruebas evaluadas.

Valor CT para el ADN del parásito	Interpretación
<i>Neospora caninum</i>	
<38	Muestra positiva
Sin señal	Muestra negativa
≥ 38 y < 40	Resultado dudoso

4.6 CONCENTRACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO DEL SUERO SANGUÍNEO DE LAS MUESTRAS.

Para medir la concentración del material genético extraído anteriormente por el RT — PCR, se realizó en el lector multimodal de imágenes celulares - Cytation⁵, haciendo uso del take 3 y el software Gen 5. La validación de la prueba de concentración de ADN se realizó considerando los parámetros correctos ($\geq 1,8$ - ≤ 2), lo cual indica que no hubo contaminación al momento de la extracción del ADN.

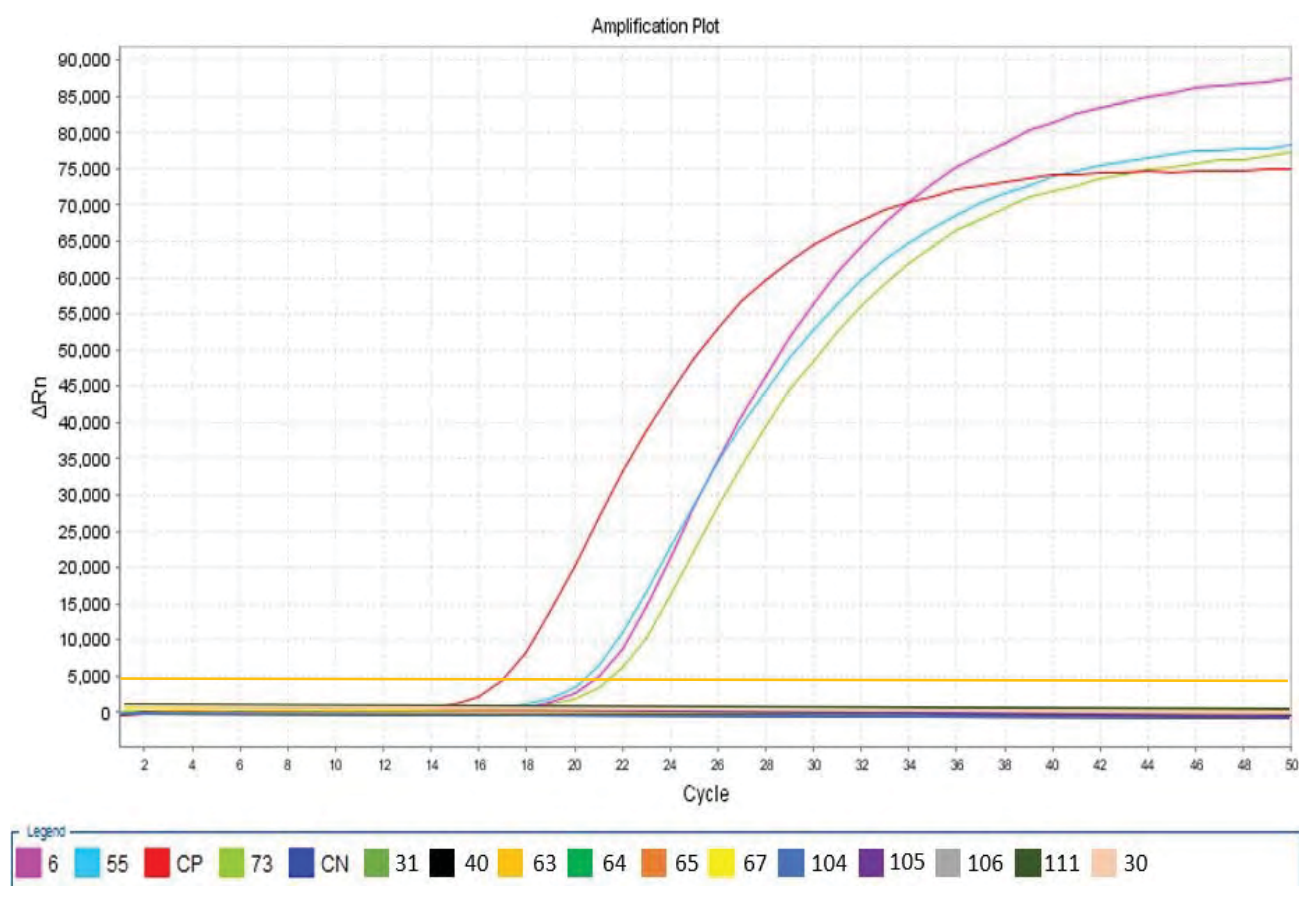
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 PREVALENCIA DE LAS MUESTRAS POSITIVAS AL ADN DEL PARÁSITO

Neospora caninum.

Para determinar la prevalencia del parásito *Neospora caninum*, se ha realizado la lectura de las muestras en el equipo de PCR — RT (Amplified Biosystems), con lo cual obtuvimos las lecturas de amplificación de las muestras positivas (ciclo umbral). Estos valores de Ct, por cada distrito evaluado, se muestran en las tablas del 09 al 13 y en los gráficos del 04 al 08.

Grafico 04: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito *Neospora caninum* en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Cachimayo.



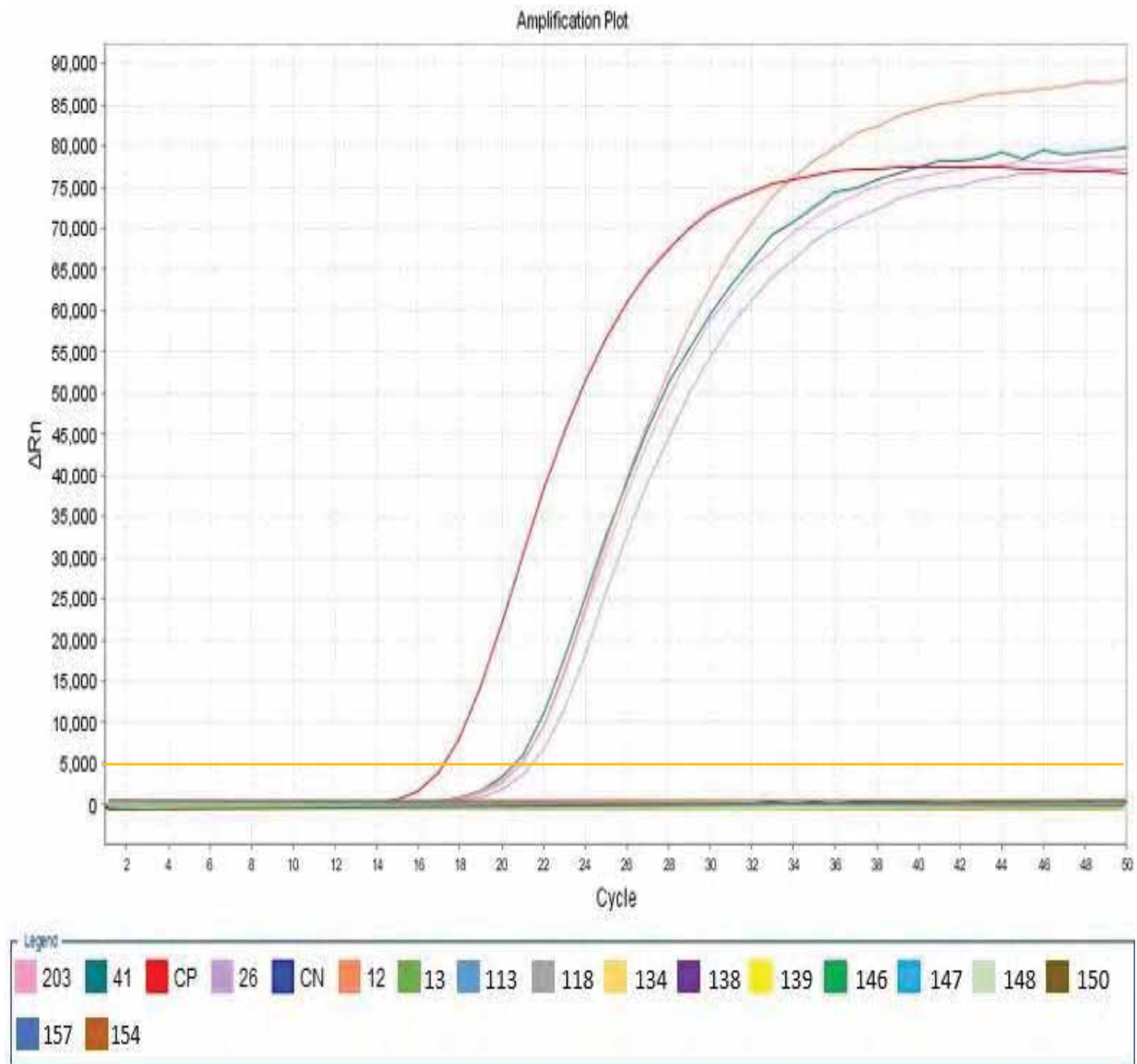
En el gráfico 04 se visualiza la amplificación de las muestras positivas al ADN del parásito *Neospora caninum* del distrito de Cachimayo, siendo las muestras 73, 6, 55 y el control positivo, las que mostraron señal de amplificación, resultando positivas al genoma del parásito *Neospora caninum*. Las muestras que no presentaron señal de amplificación son negativas, siendo estas un total de 14 muestras.

Tabla 09: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Cachimayo.

Distrito	Muestra	Ct	Resultado
Cachimayo	CP	17.93	Presenta señal
	CN	-	No presenta señal
	73	22.49	Positivo
	6	21.82	Positivo
	55	21.38	Positivo
	31	-	Negativo
	40	-	Negativo
	63	-	Negativo
	64	-	Negativo
	65	-	Negativo
	67	-	Negativo
	104	-	Negativo
	105	-	Negativo
	106	-	Negativo
111	-	Negativo	
30	-	Negativo	

En la tabla 09, se observan los valores de ciclo umbral (Ct) de las muestras positivas al genoma del parásito *Neospora Caninum*, de vacas distrito de Cachimayo. Es así que las muestras: 73, 6 y 55, presentaron valores de CT de: 22.49, 22.82 y 21.38 respectivamente, lo cual nos indican que existe el ADN del parásito en las muestras evaluadas. Las muestras que no presentan valores de Ct, son aquellas muestras que no amplificaron, por lo tanto, son negativas.

Gráfico 05: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito *Neospora caninum* en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Anta.



CN = Control negativo **CP** = Control positivo

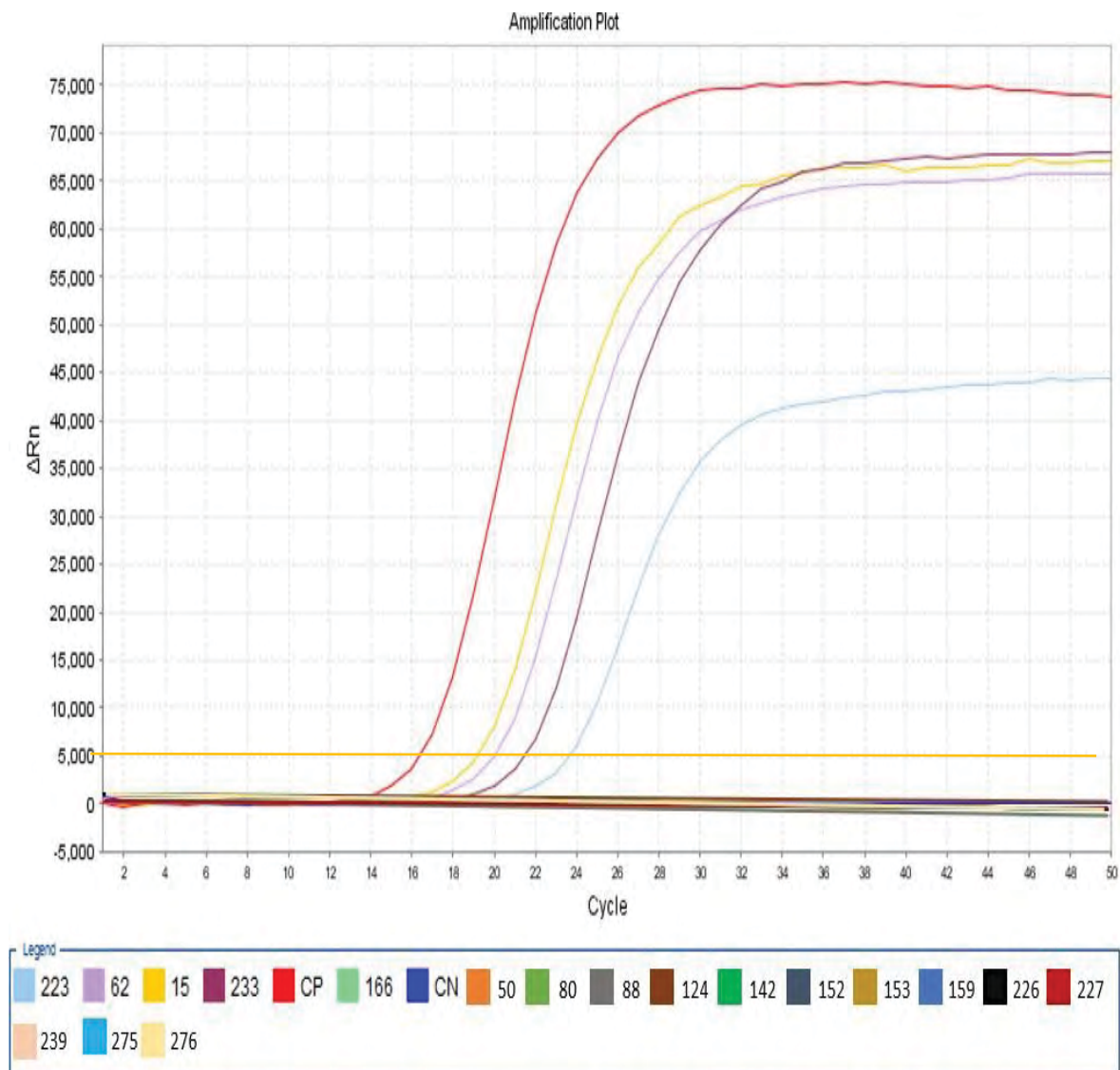
En el gráfico 05 se visualiza la amplificación de las muestras positivas al ADN del parásito *Neospora caninum* del distrito de Anta, siendo las muestras 12, 26, 203 y 41 y el control positivo, las que mostraron señal de amplificación, resultando positivas al genoma del parásito *Neospora caninum*. Las muestras que no presentaron señal de amplificación son negativas, siendo estas un total de 12 muestras.

Tabla 10: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Anta.

Distrito	Muestra	Ct	Resultado
Anta	CP	18.22	Presenta señal
	CN	-	No presenta señal
	12	21.96	Positivo
	26	22.59	Positivo
	203	21.93	Positivo
	41	21.07	Positivo
	13	-	Negativo
	113	-	Negativo
	118	-	Negativo
	134	-	Negativo
	138	-	Negativo
	139	-	Negativo
	146	-	Negativo
	147	-	Negativo
	148	-	Negativo
	150	-	Negativo
	157	-	Negativo
	154	-	Negativo

En la tabla 10, se observan los valores de ciclo umbral (Ct) de las muestras positivas al genoma del parásito *Neospora Caninum*, de vacas distrito de Anta. Es así que las muestras: 12, 26, 203, 41 y control positivo presentaron valores de CT de: 21.96, 22.59, 21.93, 21.07 y 18.22 respectivamente, lo cual nos indica que existe el ADN del parásito en las muestras evaluadas. Las muestras que no presentan valores de Ct, son aquellas muestras que no amplificaron, por lo tanto, son negativas.

Gráfico 06: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito *Neospora caninum* en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Ancahuasi.



CN = Control negativo **CP** = Control positivo

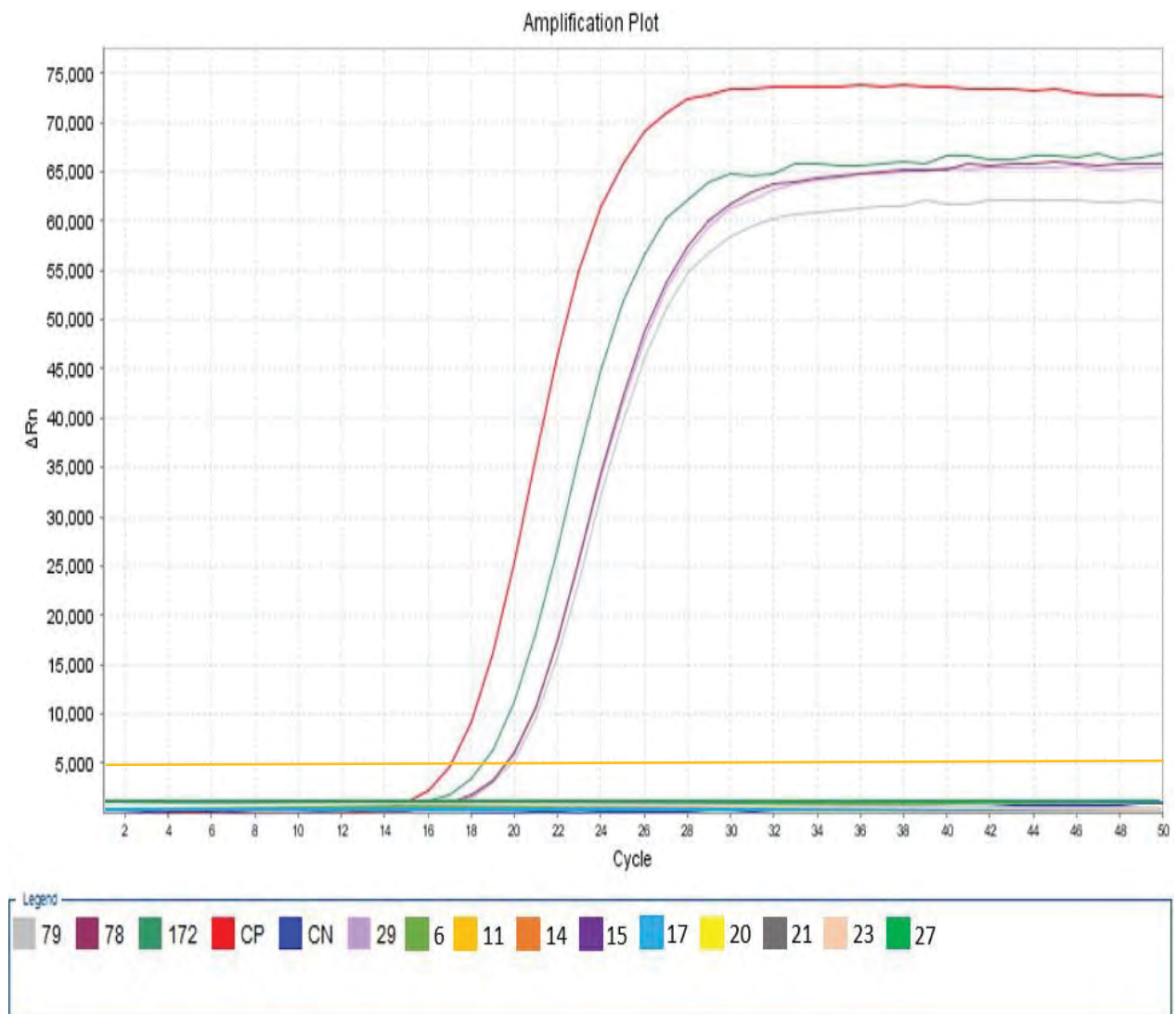
En el gráfico 06, se visualiza la amplificación de las muestras positivas al ADN del parásito *Neospora caninum* del distrito de Ancahuasi, siendo las muestras 233, 223, 66, 15, 166 y el control positivo, las que mostraron señal de amplificación, resultando positivas al genoma del parásito *Neospora caninum*. Las muestras que no presentaron señal de amplificación son negativas, siendo estas un total de 13 muestras.

Tabla 11: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Ancahuasi.

Distrito	Muestra	Ct	Resultado
Ancahuasi	CP	11.84	Presenta señal
	CN	-	No presenta señal
	233	16.44	Positivo
	223	17.29	Positivo
	62	14.71	Positivo
	15	14.15	Positivo
	166	15.43	Positivo
	50	-	Negativo
	80	-	Negativo
	88	-	Negativo
	124	-	Negativo
	142	-	Negativo
	152	-	Negativo
	153	-	Negativo
	159	-	Negativo
	226	-	Negativo
	227	-	Negativo
	239	-	Negativo
	275	-	Negativo
276	-	Negativo	

En la tabla 11, se observan los valores de ciclo umbral (Ct) de las muestras positivas al genoma del parásito *Neospora Caninum*, de vacas distrito de Ancahuasi. Es así que las muestras: 233,223, 62, 15, 166 y control positivo presentaron valores de CT de: 16.44, 17.29, 14.71, 14.15, 15.43 y 11.84 respectivamente, lo cual nos indica que existe el ADN del parásito en las muestras evaluadas. Las muestras que no presentan valores de Ct, son aquellas muestras que no amplificaron, por lo tanto, son negativas.

Gráfico 07: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito *Neospora caninum* en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Huarcocondo.



CN = Control negativo **CP** = Control positivo

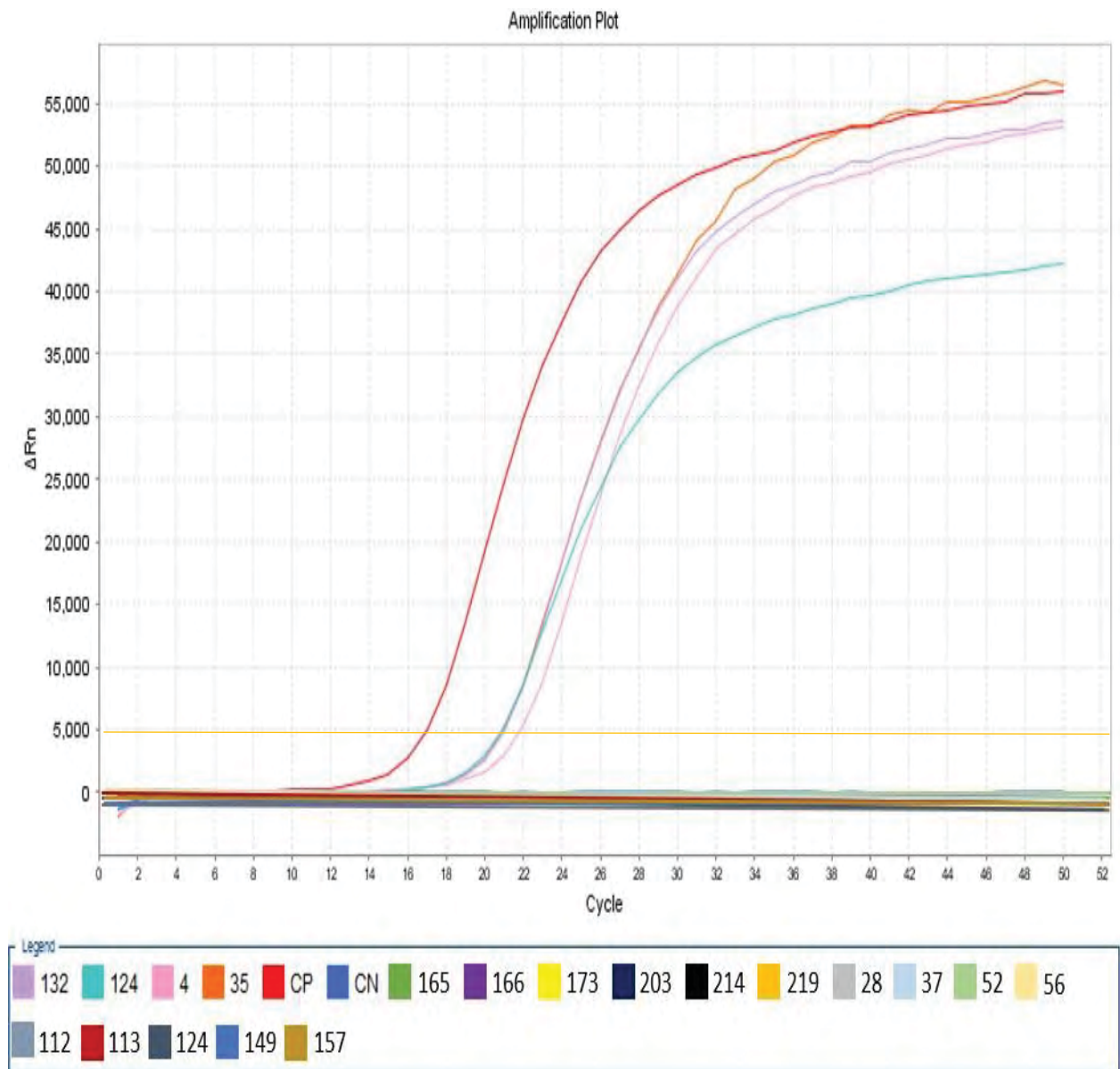
En el gráfico 07, se visualiza la amplificación de las muestras positivas al ADN del parásito *Neospora caninum* del distrito de Huarcocondo, siendo las muestras 78, 29, 79, 172 y el control positivo, las que mostraron señal de amplificación, resultando positivas al genoma del parásito *Neospora caninum*. Las muestras que no presentaron señal de amplificación son negativas, siendo estas un total de 13 muestras.

Tabla 12: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Huarcocondo.

Distrito	Muestra	Ct	Resultado
Huarcocondo	CP	11.93	Presenta señal
	CN	-	No presenta señal
	78	14.1	Positivo
	29	13.78	Positivo
	79	13.46	Positivo
	172	13.36	Positivo
	6	-	Negativo
	11	-	Negativo
	14	-	Negativo
	15	-	Negativo
	17	-	Negativo
	20	-	Negativo
	21	-	Negativo
	23	-	Negativo
	27	-	Negativo

En la tabla 12, se observan los valores de ciclo umbral (Ct) de las muestras positivas al genoma del parásito *Neospora Caninum*, de vacas distrito de Huarcocondo. Es así que las muestras: 78, 29, 79, 172 y control positivo presentaron valores de CT de: 14.01, 13.78, 13.46, 13.36 y 11.93 respectivamente, lo cual nos indica que existe el ADN del parásito en las muestras evaluadas. Las muestras que no presentan valores de Ct, son aquellas muestras que no amplificaron, por lo tanto, son negativas.

Gráfico 08: Amplificación de las muestras con presencia del ADN del parásito *Neospora caninum* en suero sanguíneo de vacas en el Distrito de Zurite.



CN = Control negativo **CP** = Control positivo

En el gráfico 08, se visualiza la amplificación de las muestras positivas al ADN del parásito *Neospora caninum* del distrito de Zurite, siendo las muestras 124, 35, 132, 4 y el control positivo, las que mostraron señal de amplificación, resultando positivas al genoma del parásito *Neospora caninum*. Las muestras que no presentaron señal de amplificación son negativas, siendo estas un total de 15 muestras.

Tabla 13: Valores del ciclo umbral (CT) de las muestras evaluadas de vacas del Distrito de Zurite.

Distrito	Muestra	Ct	Resultado
Zurite	CP	17.03	Presenta señal
	CN	-	No presenta señal
	124	20.94	Positivo
	35	20.99	Positivo
	132	21.08	Positivo
	4	21.96	Positivo
	165	-	Negativo
	166	-	Negativo
	173	-	Negativo
	203	-	Negativo
	214	-	Negativo
	219	-	Negativo
	28	-	Negativo
	37	-	Negativo
	52	-	Negativo
	56	-	Negativo
	112	-	Negativo
	113	-	Negativo
	124	-	Negativo
	149	-	Negativo
	157	-	Negativo

En la tabla 13, se observan los valores de ciclo umbral (Ct) de las muestras positivas al genoma del parásito *Neospora caninum*, de vacas distrito de Zurite. Es así que las muestras: 124, 35, 132, 4 y control positivo presentaron valores de CT de: 20.94, 20.99, 21.08, 21.96 y 17.03 respectivamente, lo cual nos indica que existe el ADN del parásito en las muestras evaluadas. Las muestras que no presentan valores de Ct, son aquellas muestras que no amplificaron, por lo tanto, son negativas.

Las muestras que resultaron positivas al ADN del parásito *Neospora caninum*, se cuantificaron con el Software Gen 5, del lector Multimodal de imágenes celulares-Cytation 5. Estas concentraciones de ADN en (ng/ul) se pueden observar.

Tabla 14: Concentración del material genético extraído del suero sanguíneo de las muestras.

Distrito	N° muestra	Concentración de ADN (ng/ul).
Cachimayo	55	1.823
Cachimayo	6	1.817
Cachimayo	73	1.937
Anta	26	1.863
Anta	203	1.936
Anta	12	1.907
Anta	41	1.971
Ancahuasi	233	1.829
Ancahuasi	223	1.892
Ancahuasi	62	1.896
Ancahuasi	15	1.973
Ancahuasi	166	1.880
Huarocondo	78	1.981
Huarocondo	29	1.850
Huarocondo	79	1.967
Huarocondo	172	1.833
Zurite	124	1.896
Zurite	132	1.975
Zurite	4	1.810
Zurite	35	1.913

En la tabla 14, se observa las concentraciones del material genético extraídos del suero sanguíneo de las vacas seronegativos a la prueba de ELISA, pero solo se observa de las 20 muestras positivas a la prueba de PCR-TR de vacas de los distritos de Cachimayo, Anta, Ancahuasi, Huarocondo y Zurite. Estos valores de concentración se encuentran de 1.810 a 1.989 ng/μl de muestra las cuales validan la extracción correcta para la prueba.

Tabla 15: Resultado de las muestras positivas y negativas al ADN del parásito *Neospora caninum*, por distrito.

Distrito	Muestras evaluadas	Muestras positivas	Muestras negativas
Cachimayo	14	3	11
Anta	16	4	12
Ancahuasi	18	5	13
Huarocondo	13	4	09
Zurite	19	4	15
Total	80	20	60

En la tabla 15, se observa un total de 80 muestras analizadas en vacas de la pampa de Anta, de los cuales 20 muestras son positivas.

Tabla 16: Prevalencia del ADN del parásito *Neospora caninum* en la Pampa de Anta.

Muestras evaluadas	Muestras positivas	Muestras negativas	Prevalencia
80	20	60	25 ± 0.084%

En la tabla 16, se observa la prevalencia del ADN del parásito del *Neospora caninum* en vacas de la Pampa de Anta, el mismo que corresponde a: 25± 0.084% (20/80).

En el presente trabajo de investigación se obtuvo una prevalencia de 25± 0.084% (20/80) del ADN del parásito *Neospora caninum* en vacas de la Pampa de Anta, correspondientes a los de distritos de Cachimayo, Anta, Ancahuasi,

Huarocondo y Zurite. La concentración del ADN del parásito *Neospora caninum* en muestras positivas, oscilo de 1.810 a 1.981 ng/μl de muestra.

Estos resultados guardan relación con lo hallado por (McInnes *et al.*, 2006), quien detectó con éxito el ADN de *Neospora caninum* en el suero con anticuerpos negativos de 79 madres, evidencio en 3 madres y 11 fetos la presencia de ADN de *Neospora caninum*, lo que hace 17.72% de prevalencia, sus resultados sugieren que la infección persistente en ausencia de anticuerpos es un posible resultado de la infección por *Neospora caninum*, asimismo indica que, la infección de los fetos en ausencia de anticuerpos respalda la posibilidad de una infección persistente debido a la inmunotolerancia a una infección temprana en el útero. Este resultado es similar con lo que se halló en el presente estudio, probablemente se debe a que, en ambos estudios se utilizó sueros negativos a la prueba de anticuerpos. Esto podría indicar que, los resultados negativos en la prueba ELISA pueden estar relacionados con una infección primaria temprana en la cual el sistema inmunológico aún no genera una respuesta o bien ésta es de baja intensidad, a la producción de anticuerpos en contra de bradizoitos y la consecuente disminución de los anticuerpos circulantes contra taquizoitos dependiendo de la etapa de infección (Yao *et al.*, 2009).

Por otro lado, (Reyes *et al.*, 2017) detectó ADN del parásito en 89.4 % de las vacas, esta prevalencia es superior a lo que se encontró en el presente trabajo de investigación, probablemente se deba a que trabajo con seropositivos a *Neospora caninum*. Asimismo (Reyes, 2016) detecto al parásito del *Neospora caninum* mediante PCR anidado en sangre, determinado que el porcentaje de animales positivos al parásito mediante la prueba de PCR anidado fueron de 55.8, 94.1, 100, 97.1, 100 para los meses uno al cinco, respectivamente, promediando 89.4 % (33/37) en el periodo estudiado, siendo de 88.0, 88.9, 87.9 % las prevalencias por cada tercio de gestación,

concluye que las vacas seropositivas a *Neospora caninum* de un hato producen menor cantidad de leche que las vacas seronegativas

Asimismo (Okeoma *et al.*, 2005), cuantificó el ADN del *Neospora caninum* en la sangre y el cerebro de 30 vaquillonas que habían abortado, el cerebro de las vaquillonas infectadas mostró una mayor concentración de ADN que la sangre, con una prevalencia del 85% dando como resultado 25 vaquillonas positivas al parásito del *Neospora caninum*. Este resultado es superior a lo obtenido en la presente investigación, probablemente a que en dicho estudio utilizaron el cerebro de las vaquillonas infectadas, por lo tanto, las concentraciones de ADN del parásito fueron superiores.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 CONCLUSION

1. Se ha detectado la presencia del ADN del parásito *Neospora caninum* en 20 vacas con diagnóstico seronegativo a la prueba de ELISA de los distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite en la Pampa de Anta de la Región del cusco. Siendo estos animales, portadores potenciales de dicho parásito.
2. Se ha determinado una prevalencia del $25\% \pm 0.084$ en un total de 80 muestras seronegativas por la prueba PCR-RT de los distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite en la Pampa de Anta de la Región del Cusco. Siendo estos animales, portadores potenciales de dicho parásito.

6.2 RECOMENDACIONES

1. Fortalecer las capacidades de los productores de vacunos de los distritos de Ancahuasi, Anta, Cachimayo, Huarcocondo y Zurite de la provincia de Anta, en temas relacionados a la prevención de enfermedades como *Neospora caninum*, ya que en su mayoría desconocen o confunden la enfermedad evaluada.
2. Realizar la compra de reproductoras de hatos certificados y que posean sus respectivos controles sanitarios.
3. Implementar medidas de bioseguridad sometiendo a los animales adquiridos a cuarentena, para evitar la propagación de la enfermedad.
4. Evitar el ingreso de perros a los establos, áreas de pastoreo y a las fuentes de agua destinados a los ganados vacunos.
5. Fomentar la desparasitación de los perros, como una medida preventiva, así reducir los efectos que esta enfermedad causa en la producción de ganado vacuno.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Almeira S. (2011).** Diagnóstico del *Neospora caninum* en ganado vacuno de Venezuela. *Biomédica*, 31(3), 23-205.
2. **Almeria S., López G. (2013).** Neosporosis bovina: Aspectos clínicos y prácticos. *RES VET SCI.* 95: 303 - 309
3. **Anderson, M., Reynolds J.P., Rowe J.D., Packham A., Barr B., Conrad P. (1997).** Evidencia de transmisión vertical del *Neospora* sp. infección en ganadolechero. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 1169-1172.
4. **Andresen, H. (1999).** Neosporosis en el Perú y el mundo. *REV. CIENC. VET.* 15: 11-16.
5. **Aycachi. (2005).** Neosporosis bovina - Parasitología. *REV. MVZ*, 12: 13-14
6. **Barling K., Mcneill J. & Wastling J. (2000).** association of serologic status for *Neospora caninum* with post weaning weight gain and carcass measurements in beef calves. *JAVMA*, 217, 1356-1360.
7. **Barr B., Anderson M., Severlow K., Conrad P. (1995).** Diagnóstico del feto bovino, infección por *Neospora caninum* con una prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes. *VET. REC*, 137, 611-613.
8. **Basso, L. Venturi, M. Rambeaud, J. Uazaga, D. Bacigalupe (1999).** Prevalencia de la infección por *Neospora caninum* en perros de Ciudad y del Tambo. XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología, 90.
9. **Bearden J. & Fuquay J. (1982).** Reproducción animal aplicada. *El Manual Moderno*, 315-319.

10. **Bjerkas I., Mohn S., Presthus J. (1984).** Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd.* 70(2): 271-274.
11. **Calandra D. (2014).** Frequency of horizontal and vertical transmission for *Sarcocystis cruzi* and *Neospora caninum* in dairy cattle. *Vet Parasitol.* 160(1-2): 51-54.
12. **Cebrian L., Barberan M. & Ferrer I. (2003).** Neosporosis y aborto en el ganado bovino. obtenido de Dpto. de patología animal. Facultad de Veterinaria: <http://www.vetuy.com/articulos/bovinos/050/0009/bov009.htm>.
13. **Conrad P., Barr B., Sverlow K., Anderson M., Daft B., Kinde H., Dubey J., Munson L., Ardans A. (1993).** In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitol.* 106(3): 239-249.
14. **Dubey JP (1988).** Neosporosis in animals - the last five years. *Vet Parasitol.* 180(1-2): 90-108.
15. **Dubey JP (1990).** Avances recientes de *Neospora caninum* y Neosporosis. *veterinary parasitology*, 1589, 1-19.
16. **Dubey JP (2003).** Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *the Korean Journal of parasitology*, 41, 1-16.
17. **Dubey JP., Schares (2006).** Diagnóstico de la Neosporosis bovina. *vet parasitol*, 140(1-2), 1-34.
18. **Echaide. (2000).** La Neosporosis bovina. jornada sobre enfermedades emergentes del bovino.
19. **Escalona F. (2010).** Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 34: 159-166.

- 20. Fernández B. Paula, Regidor C. Javier, Collantes F. Esther, Ortega M. Luis, Sales G Marcelo, C. Da S. (2014).** Caracterización genética de cepas del *Neospora caninum* a partir de muestras clínicas de fetos zebuinos obtenidos en mataderos en Goiás, Brasil. *veterinary parasitology*, 204, 3-4.
- 21. Fort. (2003).** Estudio epidemiológico en bovinos de la Provincia de la Pampa. *Vet Parasitol.* 3: 45-47
- 22. Fredes. (2003).** Neosporosis. dpto. medicina preventiva animal. facultad de ciencias veterinarias y pecuarias. universidad de chile.
- 23. Garcia V. (2008).** PCR multiplex para diagnóstico de la Neosporosis bovina. *Veterinary medicine.*132 (2): 16-19
- 24. Guy A., Gottstein B., Eperon W., Dai A., Cannas A., Hemphill G., Greif. (2001).** Efficacy of toltrazuril and Ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol. Res.* 87(1): 43- 48.
- 25. Guy, (2005).** Enfermedades de los bovinos. 4ta ed. Buenos. Inter – Medica, 2, 977-978.
- 26. Jimenez A. (2012).** *Neospora caninum* infection in breeder bulls: Seroprevalence and comparison of serological methods used for diagnosis. *Vet. Parasitol.* 124: 19-24.
- 27. Instituto Geográfico Nacional (IGN).** Mapa geográfico de Anta y sus distritos
- 28. INEI. (2012).** IV Censo Nacional Agropecuario.
- 29. Innes E., Andrianarivo G., Bjorkman C. & William D. (2002).** Conrad p.a. immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *trends parasitology*, 18, 497-504.

- 30. Lindsay D., Debvey j. & Blagburd b. (1996).** Encontrar la causa del parasito inducido a abortos en ganado vacuno. *Veterinary medicine* 4(2): 64-71.
- 31. MacAllister M., Dubey J., Lindasay D., Jolley W., Wills R, McGuire A. (1998).** Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 28 (9) 1473-1478
- 32. MacAllister M., Bjorkman M, Anderson R. & Rogers D. (2000).** Evidencia de exposicion de fuente puntual a *Neospora caninum* e inmunidad protectora en un rebaño de vacas de carne. *J AM VET MED ASSOC*, 217, 881-887.
- 33. Martinez D. Gottstein. B., S. Eperon W., Dai A., Cannas A., Hemphill G., Greif. (2012).** Efficacy of toltrazuril and Ponazuril against experimental *Neospora caninum* infection in mice. *Parasitol. Res.* 87(1): 43- 48.
- 34. Mcinnes L., Ryan U., O'Handley R., Sager H., Forshaw D & Palmer D. (2006).** Importancia diagnostica del ADN del *Neospora caninum* detectado PCRen suero de ganado bovino. *Veterinary parasitology*, 142(3-4), 207-213.
- 35. Moore. (2005).** Epidemiological investigations of abortions due to *Neospora caninum* on swiss dairy farms. *Vet Rec* 150: 538-542.
- 36. Municipalidad. Provincial de Anta. (2014).** Plan de desarrollo concertado de la Municipalidad Provincial de Anta.
- 37. Okeoma C., Stowell K., Williamson N & W. (2005).** *Neospora caninum*: cuantificacion del ADN en la sangre de vacas abortadas y preñadas infectadas de forma natural mediante PCR en tiempo real. *experimental parasitology*, 110(1), 48-55.

- 38. Oviedo T., Betancur C., Maestra P., Gonzales M., Mestra p. & Reza L. (2006).** Estudio serológico sobre Neosporosis en bovinos con problemas reproductivos en montería. REV MVZ, 12, 929-933.
- 39. Puray Ch., Chavez V., Casas A., Falcon P., Casas V. (2006).** Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del Perú. REV INV VET, 17(2), 189-194.
- 40. Radostis O., Gay C., Bood D. & Hinchcliff k. (2002).** Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. novena ed. Madrid; MCGRAW HILL — INTERAMERICANA, 2, 1035, 1553,- 1555.
- 41. Radostitis O. (2002).** Patogénesis del *Neospora caninum* Vet J. 32(4): 21- 22.
- 42. Reyes S. (2016).** Detección del *Neospora caninum* mediante PCR en sangre y su asociación con la producción láctea en bovinos. universidad autónoma del estado de México.
- 43. Reyes S., Alvarez M., Rojas M., Espinoza A., Garcia R. & Ojeda C. (2017).** Detección del *Neospora caninum* por PCR anidada en leucocitos en bovinos productores de leche. Ecosistemas y recursos agropecuarios, 4(12), 563-570.
- 44. Rosenberger M. (2005).** *Neospora caninum* infections in Australia and New Zeland Aust Vet. J. 78(4): 258-261
- 45. Santana O., Cruz C., Medina L., Parra M., Morales C. & Gallardo D. (2010).** Detección de ADN en sangre durante la primera gestación de vaquillas infectadas naturalmente. Veterinaria México, 41(2), 131-137.

46. **SENASA. (2010).** Informe final de la caracterización de enfermedades reproductivas en el Perú.
47. **SENAMHI. (2010).** Caracterización Agroclimática de la Región Cusco. Programa de Adaptación al Cambio Climático PACC - Perú.
48. **Silva, P., Chávez A., Rivera H., Casas E. (2002).** Seroprevalencia de *Neospora caninum* en bovinos lecheros del valle de Lima. REV. INV. VET., PERÚ 13: 51-55.
49. **Thermofisher scientific.** Representación gráfica de datos de PCR en tiempo real.
50. **Thilsted JP., Dubey JP. (1989).** Neosporosis like abortions in a herd of dairy cattle. J Vet Diagn Invest. 1(3): 205-209.
51. **Tranas J., Heinzen R. (1999).** Serological Evidence of Human infection with protozoan *Neospora caninum*. Clin Diagn. Lab. Immunol. 6 (5): 765-767.
52. **Trees A., Davison H., Innes E & Wastling j. (1999).** Economic impact of bovine Neosporosis. international journal of parasitology, 20, 1195-1200.
53. **UCM (Universidad Central de México). (2019).** Detección de *Neospora caninum* en muestras de semen bovino. VET INNOVA, 1.
54. **Valenzuela. (2005).** Neosporosis en bovinos y caninos. Patología veterinaria, 2(1), 17-33.
55. **Vargas J., Cortez J. (2001).** *Neospora caninum*: ¿Una zoonosis potencial? Rev. Salud publica 3(1): 89 - 93.
56. **Wouda W. (1998).** *Neospora caninum*. Aborto en ganado bovino diagnóstico y epidemiología. Tesis universitaria, 1, 176.

57. Youngquist S., Jakubek P., Thebo, H., Kindahl y Bjorkman. (2007). Oral *Neospora caninum* inoculación of neonatal calves. Int J Parasitol. 28: 1467-1472.

58. Zambrano A., Hemphill A., Gottstein B. y Kauffman H.(2001). Adhesion and invasion of bovine endothelial cells by *Neospora caninum*. Parasitology. 112: 183-197.

ANEXOS

Anexo 1: Cálculos para determinar el tamaño de muestras con resultados negativos a la prueba de ELISA.

$$n = \frac{N * Z^2 P * Q}{(N - 1) * E^2 + Z^2 (P * Q)}$$

Dónde:

N: Tamaño poblacional

Z: 1.76, nivel de confianza que se da a la muestra

P: animales positivos a *Neospora caninum* por ELISA

Q: animales negativos a *Neospora caninum* por ELISA

E: error experimental 0.09

$$n = \frac{927 * (1.76)^2 (0.35 * 0.65)}{(927 - 1) * (0.09)^2 + (1.76)^2 (0.35 * 0.65)}$$

653.2606

8.2053

$n = 79.61$

n = 80

Anexo 02: Cálculos para determinar la prevalencia del ADN del parásito *Neospora caninum* en vacas de la Pampa de Anta.

$$P = \frac{20}{80} * 100$$

$$P = 25 \%$$

Índice de corrección:

$$IC = p \pm z \sqrt{\frac{p \times q}{n}}$$

$$IC = 25 \pm 1.76 \sqrt{\frac{0.25 \times 0.75}{80}}$$

$$IC = 25 \pm 1.76 \sqrt{\frac{0.1875}{80}}$$

$$IC = 25 \pm 1.76 \sqrt{0.002344}$$

$$IC = 25 \pm 1.76 * 0.048$$

$$IC = 25 \pm 0.084$$

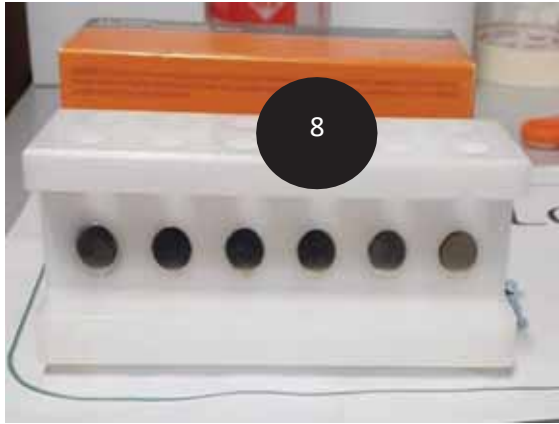
Anexo 03: EPP (Equipos de materiales de protección), utilizados al momento de realizar la prueba de PCR-RT.



En el anexo 03: se observa 1.- guantes de látex, 2.- gorro. 3.- barbijo. 4.- mandil de laboratorio.

Anexo 04: Materiales y equipos utilizados para la extracción y detección del genoma del *Neospora caninum*.





En el anexo 04, se muestran los siguientes materiales y equipos: 1.- cabina de flujo laminar, 2.- equipo de RT – PCR, 3.- micropepitetas, 4.- vortex, 5.- centrifuga, 6.- termbloque, 7.- Cytation 5, 8.- rack magnético, 9.-pipetas de 10 ul. – 100 ul. – 1000 ul. 10.-tubos de reacción rápida, 11.- placa, 12.- rotulador, 13.- viales.

Anexo 05: Reactivos utilizados para la extracción del material genético del parásito del *Neospora caninum*.



En el anexo 05, se observa los reactivos utilizados: 1.- lysis solution, 2.- binding solution, 3.- wash solution 2, 4.- wash solution 1, 5.- proteina k, 6.- perlas magneticos, 7.- elution buffer.

Anexo 06: Reactivos utilizados para la identificación del genoma del parásito del *Neospora caninum*.



En el anexo 06: se observa 1.- Master mix 2X q.PCR, 2.- control positivo, 3.- agua libre de RNA/DNA, 4.- primer/probe.

Anexo 07: Concentraciones del material genético extraído del suero sanguíneo de las 80 muestras (≥ 1.8 , < 2).

N ^a	Cachimayo		Anta		Acahuasi		Huarcocondo		Zurite	
	MUESTRA	concentrac.	MUESTRA	concentrac.	MUESTR A	concentrac.	MUESTRA	concentrac.	MUESTRA	concentrac.
1	73	1.937	12	1.907	233	1.829	78	1.981	124	1.896
2	6	1.817	26	1.863	223	1.892	29	1.850	35	1.913
3	55	1.823	203	1.936	62	1.896	79	1.967	132	1.975
4	31	1.889	41	1.971	15	1.973	172	1.833	4	1.810
5	40	1.876	13	1.874	166	1.643	6	1.954	165	1.968
6	63	1.856	113	1.974	50	1.965	11	1.927	166	1.964
7	64	1.915	118	1.963	80	1.598	14	1.878	173	1.898
8	65	1.946	134	1.846	88	1.934	15	1.856	203	1.852
9	67	1.862	138	1.869	124	1.928	17	1.878	214	1.819
10	104	1.862	139	1.891	142	1.845	20	1.954	219	1.928
11	105	1.954	146	1.823	152	1.898	21	1.933	28	1.989
12	106	1.831	147	1.932	153	1.934	23	1.902	37	1.898
13	111	1.964	148	1.967	159	1.954	27	1.852	52	1.867
14	30	1.889	150	1.952	226	1.886			56	1.898
15			157	1.974	227	1.978			112	1.977
16			154	1.821	239	1.989			113	1.961
17					275	1.878			124	1.803
18					276	1.956			149	1.968
19									157	1.986

Anexo 08: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN del parásito del *Neospora caninum* la prueba del PCR-TR del distrito deCachimayo.

DISTRITO DE CACHIMAYO

N°	Sector	Propietario	N° Vaca	Nombre	Diagnostico
1	Álamos	Walter Curi La Torre	73	Sandra	Positivo
2	Quinta Cajamarca	Johan Paucarmayta Becerra	6	Ingrid	Positivo
3	Álamos	Ccoya Curí Florencia	55	Jersey	Positivo
4	Quinta Cajamarca	Johan Paucarmayta Becerra	31	Paty	Negativo
5	Granja 3	Jose Cardenas	40	Eulalia	Negativo
6	Granja 3	Ccoya Curi Florencia	63	Isabel	Negativo
7	Granja 2	Ccoya Curi Florencia	64	Chavela	Negativo
8	Granja 2	Ccoya Curi Florencia	65	Juanita	Negativo
9	Granja 1	Ccoya Curi Florencia	67	Cachuda	Negativo
10	Álamos	Walter Curi La Torre	104	Perla	Negativo
11	Álamos	Walter Curi La Torre	105	Rubí	Negativo
12	Álamos	Walter Curi La Torre	106	Amorosa	Negativo
13	Álamos	León Salas Carlos	111	Rojita	Negativo
14	Quinta Cajamarca	Johan Paucarmayta Becerra	30	Gabriela	Negativo

Anexo 09: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN del parásito del *Neospora caninum* la prueba del PCR-TR del distrito de Anta.

DISTRITO DE ANTA

N°	SECTOR	PROPIETARIO	N° VACA	NOMBRE	DIAGNOSTICO
1	Compone	Humberto Huallparimachi	41	Gloria	POSITIVO
2	Occoruro	Pacco Huanca Benigno Rodríguez	12	Carla	POSITIVO
3	Occoruro	Haite Huamán Juan	26	Doris	POSITIVO
4	Compone	Julieta Paredes Huanca	203	Camila	POSITIVO
5	Occoruro	Pacco Huanca Benigno Rodríguez	13	Melchora	NEGATIVO
6	Occoruro	Castilla Rocca Mario	113	Tintina	NEGATIVO
7	Occoruro	Sinchi Huallparimachi Bernardo	118	Mora vaca	NEGATIVO
8	Compone	Julio Rayme Huallparimachi	134	Kiara	NEGATIVO
9	Compone	Julio Rayme Huallparimachi	138	Lucha	NEGATIVO
10	Compone	Julio Rayme Huallparimachi	139	Loca	NEGATIVO
11	Compone	Valentín Kancha López	146	Azucena	NEGATIVO
12	Compone	Valentín Kancha López	147	Andrómeda	NEGATIVO
13	Compone	Valentín Kancha López	148	Malú	NEGATIVO
14	Compone	Valentín Kancha López	150	Segunda	NEGATIVO
15	Compone	Valentín Kancha López	157	Sandunga	NEGATIVO
16	Compone	Ricardo Mantilla Huanaco	154	Nana	NEGATIVO

Anexo 10: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN del parásito del *Neospora caninum* la prueba del PCR-TR del distrito de Ancahuasi.

DISTRITO DE ANCAHUASI

N°	SECTOR	PROPIETARIO	N° VACA	NOMBRE	DIAGNOSTICO
1	Ccacahuara	Rosa Huaman Sánchez	233	Linda	POSITIVO
2	Ancahuasi	Honorata Quispe Ttupa	223	Isabela	POSITIVO
3	Succahuara	Martha Atausupa Huallpa	62	Negra	POSITIVO
4	San Martin	Seledonio Cjumo	15	Isidora	POSITIVO
5	Ccacahuara	Juana Huaman	166	Lucia	NEGATIVO
6	Succahuara	Maria Antonieta Chambi	50	Fernanda	NEGATIVO
7	Ancahuasi	Agustina Meza Quispe	80	Estrella	NEGATIVO
8	Ancahuasi	Justina Arias	88	Sandra	NEGATIVO
9	Asoc. Misti Soccomarca	Paulina Ccompi H.	124	Beatriz	NEGATIVO
10	Asoc. Misti Soccomarca	Hermelinda Mendoza	142	Clarita	NEGATIVO
11	Asoc. Misti Soccomarca	Virgilo Huaman	152	Anita	NEGATIVO
12	Asoc. Misti Soccomarca	Virgilo Huaman	153	Isidora	NEGATIVO
13	Asoc. Misti Soccomarca	Teodora Quispe Ayme	159	Ruty	NEGATIVO
14	Ccacahuara	Máxima Castro Chávez	226	Tomasa	NEGATIVO
15	Ccacahuara	Máxima Castro Chávez	227	Valentina	NEGATIVO
16	Ccacahuara	Viviana Cjumo	239	Elena	NEGATIVO
17	Chamancalla	Jesús Medina	275	Luzmila	NEGATIVO
18	Chamancalla	Jesús Medina	276	Paula	NEGATIVO

Anexo 11: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN del parásito del *Neospora caninum* la prueba del PCR-TR del distrito.

DISTRITO DE HUAROCONDO

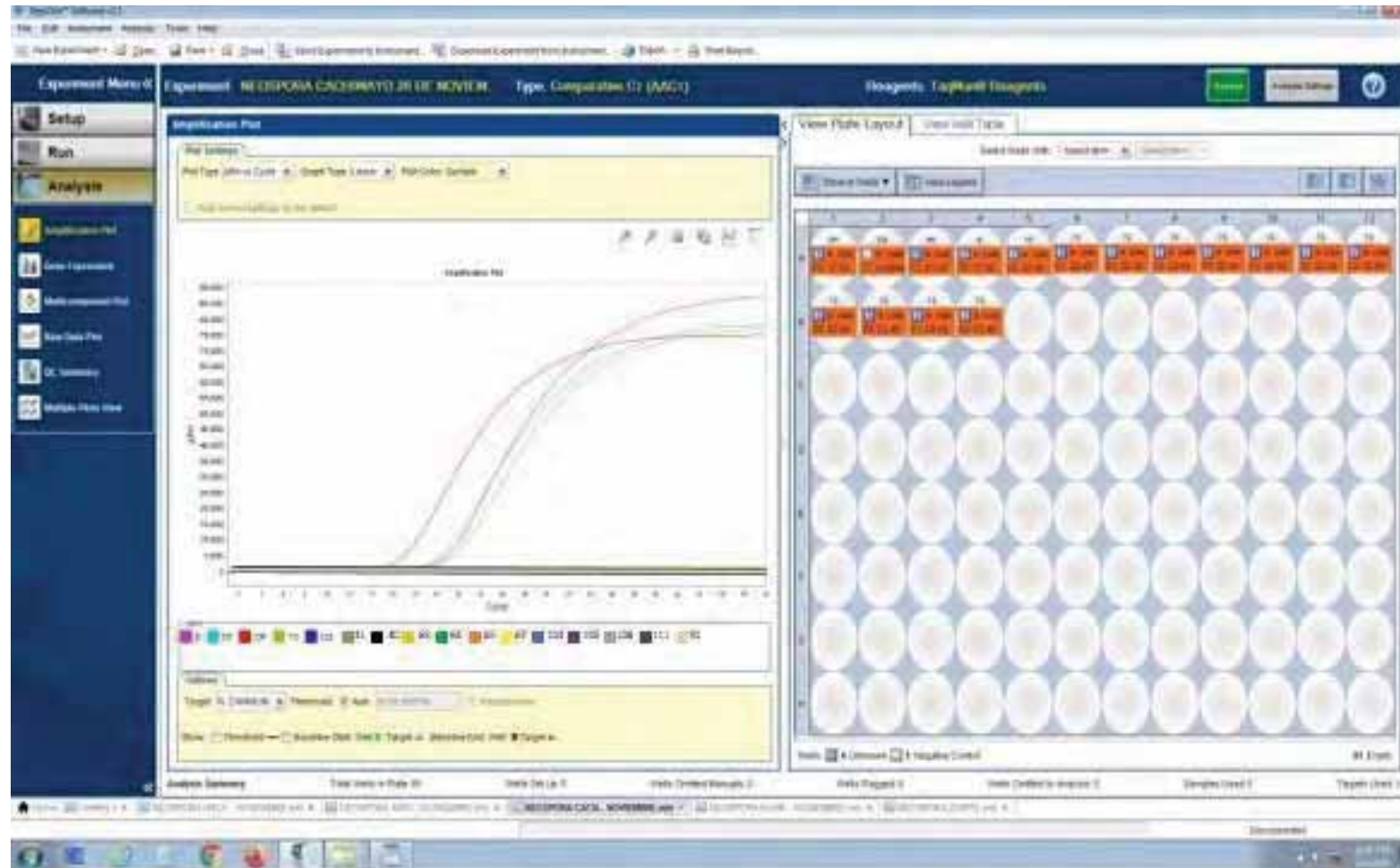
N°	SECTOR	PROPIETARIO	N° VACA	NOMBRE	DIAGNOSTICO
1	Rawanqui	Comunidad	78	Frente media luna	POSITIVO
2	Rawanqui	Comunidad	29	Cachuda rojiza	POSITIVO
3	Rawanqui	Comunidad	79	Dálmata chata cachuda	POSITIVO
4	Rawanqui	Comunidad	172	Pezón blanco - mancha	POSITIVO
5	Rawanqui	Eliseo Huallpa	6	s/n	NEGATIVO
6	Rawanqui	Dionicio Uturnco	11	Flor	NEGATIVO
7	Rawanqui	Comunidad	14	Lombita	NEGATIVO
8	Rawanqui	Comunidad	15	Negra cachuda	NEGATIVO
9	Rawanqui	Comunidad	17	Cola blanca mancha grande	NEGATIVO
10	Rawanqui	Comunidad	20	Pecho blanco, raya blanca cerca de grupa	NEGATIVO
11	Rawanqui	Comunidad	21	Mocha con más blanco herida en la cola	NEGATIVO
12	Rawanqui	Comunidad	23	Abusadora	NEGATIVO
13	Rawanqui	Comunidad	27	Vaca con arete	NEGATIVO

Anexo 12: Registro de las vacas positivos y negativos al ADN del parásito del *Neospora caninum* la prueba del PCR-TR del distrito de Zurite.

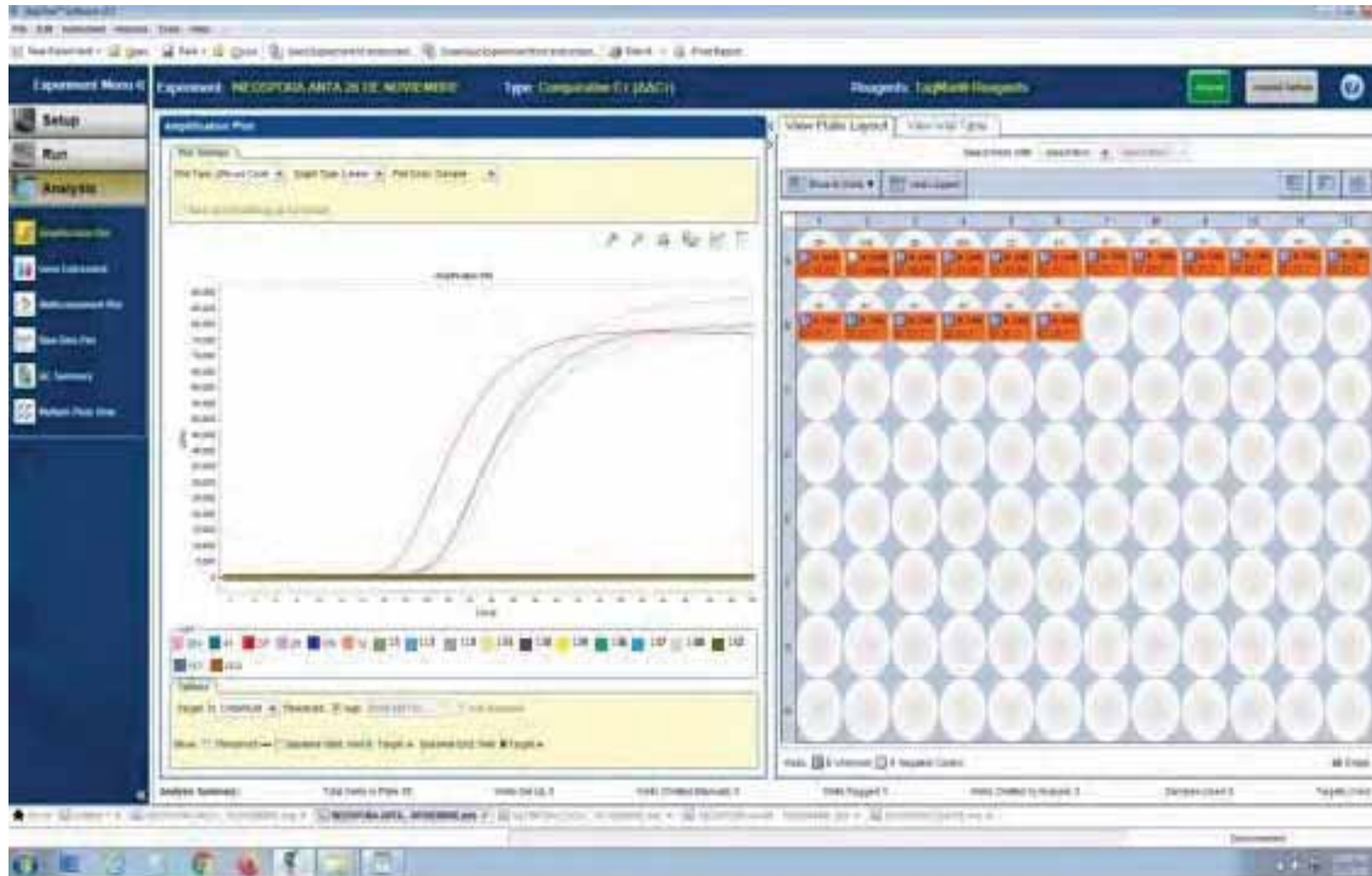
DISTRITO DE ZURITE

N°	SECTOR	PROPIETARIO	N° VACA	NOMBRE	DIAGNOSTICO
1	Tambo Real	Ana Maria Ucrus	124	Analisi	POSITIVO
2	Ancachuro	Evangelina Ttito Silva	35	Negrita	POSITIVO
3	Ancachuro	Delia Álvaro Pacachuco	132	Chaska	POSITIVO
4	Tambo Real	Alicia Quispe Succno	4	Estrella	POSITIVO
5	Ancachuro	Alberto Tapara Aguilar	165	Karina	NEGATIVO
6	Ancachuro	Alberto Tapara Aguilar	166	Lobita	NEGATIVO
7	Ancachuro	Martha Succno Quispe	173	Frente blanca	NEGATIVO
8	Ancachuro	Juana Paula Succno Morrano	203	Carolina	NEGATIVO
9	Ancachuro	Santusa Succno Paguada	214	Cara blanca	NEGATIVO
10	Ancachuro	Santusa Succno Paguada	219	Blanca pequeña	NEGATIVO
11	Tambo Real	Ángel Huari Leva	28	Paloma	NEGATIVO
12	Tambo Real	Pablo Lenes Quispe	37	Zuriteña	NEGATIVO
13	Tambo Real	Juan Huamantla Paucar	52	Valeriana	NEGATIVO
14	Tambo Real	Leucadio Huari Tumpay	56	Jose	NEGATIVO
15	Tambo Real	Maria Luz Tumpay	112	Nati	NEGATIVO
16	Tambo Real	Maria Luz Tumpay	113	Juma	NEGATIVO
17	Tambo Real	Ana Maria Ucrus	124	Analisi	NEGATIVO
18	Tambo Real	Paulina Salas	149	s/n	NEGATIVO
19	Tambo Real	Eleuteria Quispe	157	s/n	NEGATIVO

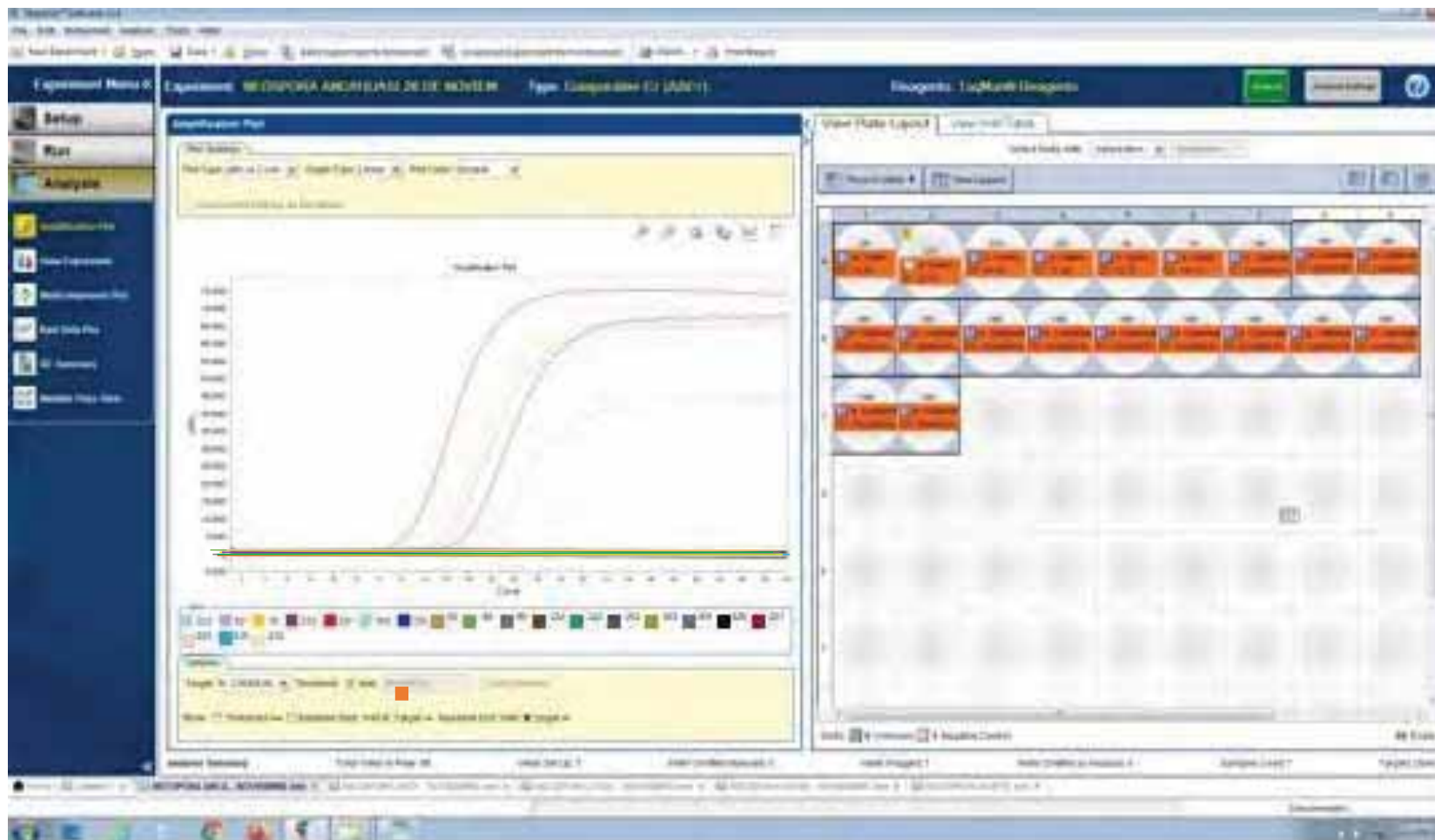
Anexo 13: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Cachimayo.



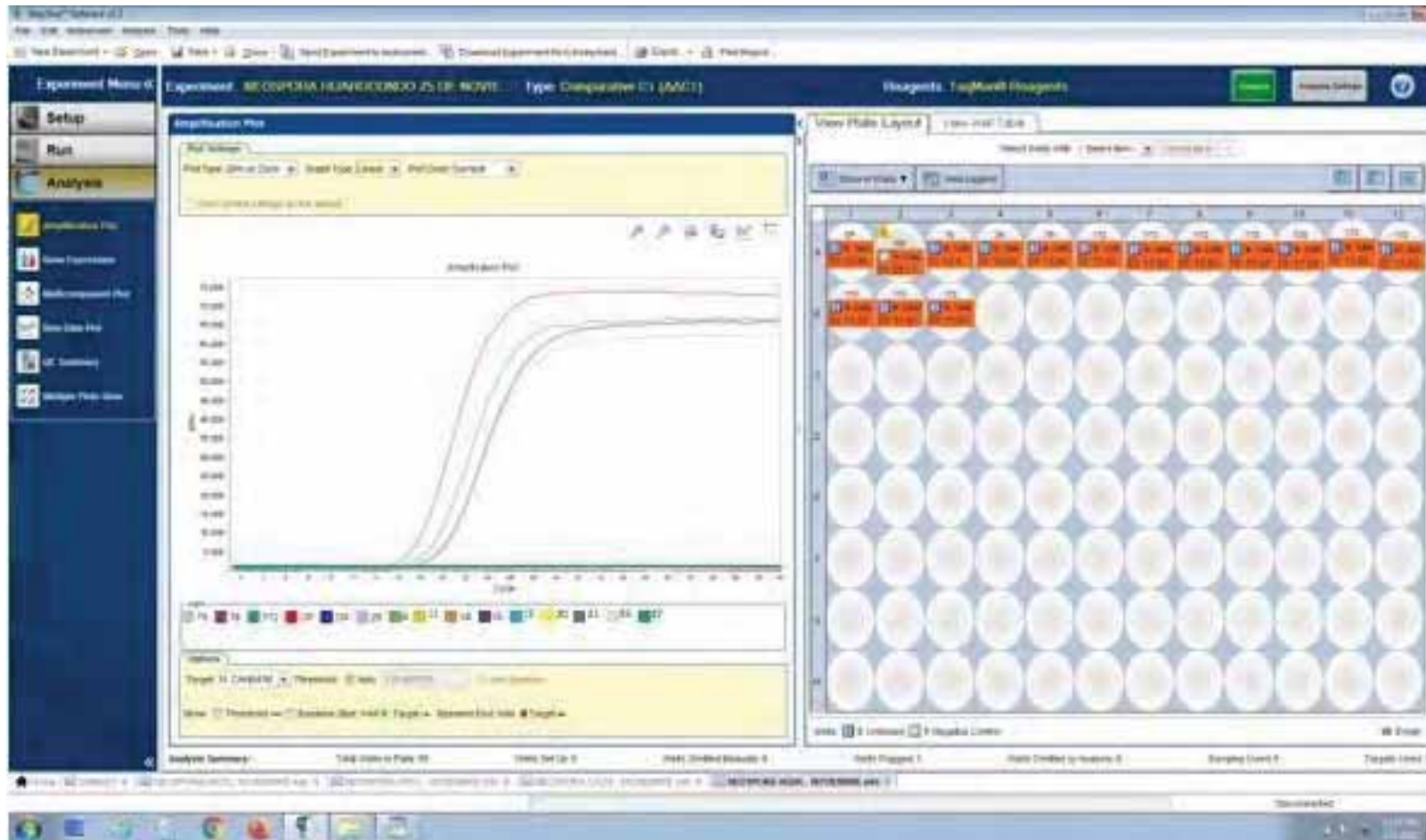
Anexo 14: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Anta.



Anexo 15: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Ancahuasi.



Anexo 16: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Huarcocondo



Anexo 17: Captura de pantalla de las lecturas realizadas con el software del equipo del PCR-TR de las muestras analizadas del distrito de Zurite.

