



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Título: “Evaluación de la aplicación de dos ensayos moleculares (PCR y LAMP) para la identificación de material genético de *Neospora caninum* en sangre de *Canis lupus familiaris* (perro)”.

Tesis previa a la obtención del título de: Médico Veterinario Zootecnista

Autores: Marcela Estefanía Abril Vásquez C.I. 0104811930
Nidia Mirella Siguenza Guaman C.I. 0107467847

Director: Dr. Antonio Javier Vallecillo Maza C.I. 0151059417

Cuenca - Ecuador

2019



RESUMEN

Neospora caninum es un parásito apicomplexa, agente etiológico de la neosporosis, una enfermedad considerada de gran importancia en las pérdidas productivas y reproductivas de los bovinos y de daño neuromuscular en los perros, con presencia a nivel mundial. Este parásito protozoario se mantiene en el medio ambiente por un ciclo heteroxeno que involucra como hospedador definitivo al perro (*Canis familiaris* o *Canis lupus familiaris*) y otros animales del género *Canis* como el Coyote (*Canis latrans*) o el Dingo (*Canis lupus dingo*) y posee varios hospedadores intermediarios, siendo el más importante el ganado bovino. El objetivo de este estudio fue comparar dos técnicas moleculares, PCR y LAMP para la identificación de material genético de *N. caninum*, en muestras de sangre periférica obtenidas de perros, sin distinción de sexo, edad o raza, de las zonas ganaderas aledañas a la ciudad de Cuenca que conviven con bovinos y están expuestos al consumo de restos biológicos de estos animales, siendo ésta la población más susceptible a desarrollar daños en su salud por parte de éste parásito y menores posibilidades de cura. Se tomaron muestras de sangre de 100 perros para posteriormente extraer el ADN total de cada una de ellas y aplicar ambos métodos moleculares, los resultados obtenidos mostraron 2 muestras positivas a *N. caninum* en PCR y 3 positivas en LAMP, en el análisis estadístico aplicado con las pruebas de Chi-cuadrado y *F*-Fisher, se encontró que no hay diferencia estadística entre los resultados obtenidos al aplicar estos métodos moleculares, es decir, este estudio sugiere que ambos ensayos son igual de eficientes para identificar material genético de *N. caninum* en la sangre periférica de los perros. Finalmente, ambas técnicas son consideradas de alta especificidad y sensibilidad tanto analítica como diagnóstica en comparación con las pruebas de tipo serológico aplicables para al diagnóstico de ésta enfermedad, sin embargo el ensayo LAMP es más factible de ser aplicado en condiciones de recursos limitados al no requerir equipos costosos para su realización.

Palabras clave: *Neospora caninum*, PERROS, PCR, LAMP



ABSTRACT

Neospora caninum is an Apicomplexa parasite, the etiological agent of neosporosis, a disease considered of great importance in the productive and reproductive losses of bovines and neuromuscular damages in dogs, with a worldwide presence. This protozoan parasite is kept in the environment by a heteroxen cycle that involves as a definitive host the dog (*Canis familiaris* or *Canis lupus familiaris*) and other animals of the *Canis* genus such as Coyote (*Canis latrans*) or Dingo (*Canis lupus dingo*) and it has several intermediate hosts, the most important being cattle. The objective of this study was to compare two molecular techniques, PCR and LAMP for the identification of genetic material of *N. caninum*, in peripheral blood samples obtained from dogs, without distinction of sex, age or breed, from the livestock areas adjacent to the city of Cuenca that live with bovines and are exposed to the consumption of biological waste of these animals, this being the population most susceptible to develop damage to their health from this parasite and less chance of cure. For the above, blood samples were taken from 100 dogs to subsequently extract the total DNA from each of them and apply both molecular methods, the results obtained showed two positive samples to *N. caninum* in PCR and 3 positive in LAMP, in the statistical analysis applied with Chi-square and F-Fisher tests, it was found that there is no statistical difference between the results obtained when applying these molecular methods, that is, this study suggests that both tests are equally efficient to identify genetic material from *N. caninum* in the peripheral blood of dogs. Finally, both techniques are considered highly specific and sensitive, both analytical and diagnostic compared to the serological tests applicable for the diagnosis of this disease, however the LAMP assay is more feasible to be applied in limited resource conditions since it does not require expensive equipment for its realization.

Key words: *Neospora caninum*, DOGS, PCR, LAMP



INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
INDICE DE TABLAS.....	8
INDICE DE FIGURAS.....	8
INDICE DE ANEXOS.....	8
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	9
CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	10
CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	12
AGRADECIMIENTO	14
DEDICATORIA	15
Objetivo general	17
Objetivos específicos.....	17
Hipótesis.....	17
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. GENERALIDADES	18
2.2. ANTECEDENTES.....	18
2.2.1 CICLO BIOLÓGICO.....	19
2.3. PERROS	20
2.3.1. SIGNOS CLÍNICOS.....	20
2.3.2. TRANSMISIÓN.....	21
2.3.3. PATOGENIA.....	22
2.3.4. DIAGNÓSTICO.....	23



2.3.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
2.3.4.2. Técnica de Amplificación Isotérmica mediada por bucle o lazo (LAMP).....	24
2.4. BOVINOS	25
2.5. OTRAS ESPECIES	26
2.6. FACTOR DE RIESGO DE PERROS PARASITADOS PRESENTES EN LAS FINCAS	26
2.7. MEDIDAS DE CONTROL.....	27
CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
3.1. Área de estudio y unidad de análisis	28
3.2. Recolección y trasporte de muestras.....	28
3.2.1. Materiales de trabajo	28
3.2.2. Materiales químicos.....	28
3.2.3. Procedimiento.....	28
3.3. Extracción de ADN	29
3.3.1. Materiales biológicos	29
3.3.2. Soluciones	29
3.3.3. Equipos.....	29
3.3.4. Proceso para la extracción de ADN de muestras de sangre completa.....	29
3.4. Amplificación de control del proceso de ADN total de las muestras de sangre.....	30
3.4.1. Materiales biológicos	30
3.4.2. Soluciones	30
3.4.3. Equipos.....	30
3.4.4. Procedimiento para la amplificación de control del proceso de ADN total de las muestras de sangre	31
3.5. Detección por electroforesis de los amplicones en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio	32



3.5.1. Materiales biológicos	32
3.5.2. Materiales químicos y reactivos.....	32
3.5.3. Materiales de laboratorio y equipos	32
3.5.4. Procedimiento de electroforesis de los amplicones en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio.....	33
3.6. Amplificación del producto de PCR del patógeno (<i>N. caninum</i>)	34
3.6.1. Material biológico.....	34
3.6.2. Materiales químicos y reactivos.....	34
3.6.3. Materiales de laboratorio y equipos	34
3.6.4. Procedimiento para amplificación del producto de PCR del patógeno (<i>N. caninum</i>).....	34
3.7. Amplificación del ADN de <i>N. caninum</i> mediante el ensayo LAMP	35
3.7.1. Materiales biológicos	35
3.7.2. Materiales químicos o reactivos	35
3.7.4. Procedimiento de la amplificación de ADN de <i>N. caninum</i> mediante el ensayo de LAMP	36
3.8. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio	38
3.8.1. Materiales biológicos	38
3.8.2. Materiales químicos y reactivos.....	38
3.8.3. Materiales de laboratorio y equipos	38
3.8.4. Procedimiento de la detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel al 1.5% de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio	39
3.9. Análisis estadístico.	39
CAPITULO IV: RESULTADOS	40
4.1. Ubicación geográfica mediante coordenadas de las muestras tomadas	40



4.2. Ensayo de PCR del control de proceso	40
4.3. Ensayo de PCR para la detección de material genético de <i>N. caninum</i> en las muestras de sangre total	42
4.4. Ensayo de LAMP para la detección de material genético de <i>N. caninum</i> en las muestras de sangre total	43
4.5. Comparación de los ensayos de PCR y LAMP mediante tablas de contingencia. .	44
CAPITULO V: DISCUSIÓN	45
CAPITULO VI: CONCLUSIONES.....	47
CAPITULO VII: RECOMENDACIONES	47
CAPITULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
CAPITULO IX: ANEXOS	53



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los resultados obtenidos con la aplicación de los ensayos de PCR y LAMP para la detección de material genético de <i>N. caninum</i> en 100 muestras de sangre total de perros.....	44
--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de parroquias rurales de Cuenca y ubicación geográfica mediante coordenadas de las muestras tomadas.	40
Figura 2. Productos de amplificación de la PCR del control de proceso.	41
Figura 3. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos en los ensayos para la detección de material genético de <i>N. caninum</i> en muestras de sangre total.....	42
Figura 4. Electroforesis de los productos de amplificación de ADN de <i>N. caninum</i> mediante el ensayo LAMP.....	43

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Registro de toma de muestras, coordenadas, edad, sexo y resultados del control de proceso, PCR y LAMP.	53
---	----



Universidad de Cuenca

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

Abreviatura o símbolo:	Significado:
x g	Gravedad
Rpm	Revoluciones por minuto
MI	Mililitro
MI	Microlitro
g	Gramo
Mg	Miligramos
Mg	Microgramo
M	Molar
Mm	Milimolar
Mm	Micromolar
NaCl	Cloruro de sodio
HCl	Ácido clorhídrico
Ph	Potencial de Hidrógeno
H	Hora
Min	Minuto
s	Segundo
No. cat.	Número de catálogo
U	Unidades
Bp	Pares de bases, del Inglés <i>base pairs</i>
LAMP	Amplificación isotérmica mediada por bucle o lazo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato



Universidad de Cuenca

CLAUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Cláusula de Propiedad Intelectual

Marcela Estefanía Abril Vásquez, autor/a del trabajo de titulación “Evaluación de la aplicación de dos ensayos moleculares (PCR y LAMP) para la identificación de material genético de *Neospora caninum* en sangre de *Canis lupus familiaris* (perro)”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, enero de 2019

A handwritten signature in blue ink that reads "Marcela Abril Vásquez".

Marcela Estefanía Abril Vásquez

C.I: 0104811930

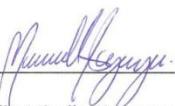


Universidad de Cuenca

Cláusula de Propiedad Intelectual

Nidia Mirella Siguenza Guaman autor/a del trabajo de titulación “Evaluación de la aplicación de dos ensayos moleculares (PCR y LAMP) para la identificación de material genético de *Neospora caninum* en sangre de *Canis lupus familiaris* (perro)”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, enero de 2019



Nidia Mirella Siguenza Guaman

C.I: 0107467847



Universidad de Cuenca

CLÁUSULA DE LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Marcela Estefanía Abril Vásquez en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación de la aplicación de dos ensayos moleculares (PCR y LAMP) para la identificación de material genético de *Neospora caninum* en sangre de *Canis lupus familiaris* (perro)", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, enero de 2019

A handwritten signature in black ink, which appears to read "Marcela Estefanía Abril Vásquez". It is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Marcela Estefanía Abril Vásquez

C.I: 0104811930



Universidad de Cuenca

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Nidia Mirella Siguenza Guaman en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Evaluación de la aplicación de dos ensayos moleculares (PCR y LAMP) para la identificación de material genético de *Neospora caninum* en sangre de *Canis lupus familiaris* (perro)”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, enero de 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Nidia Mirella Siguenza Guaman".

Nidia Mirella Siguenza Guaman

C.I: 0107467847



Universidad de Cuenca

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a todas aquellas personas que formaron parte de este proyecto de investigación y de manera especial a nuestro querido director de tesis el Dr. Antonio J. Vallecillo PhD, quién nos brindó su confianza y apoyo incondicional durante todo el transcurso de nuestra formación y trabajo de titulación.

También agradecemos a nuestros padres y hermanos que de una u otra manera colaboraron con su compañía, amor y consejos a lo largo de todo este proceso.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación primeramente a mis padres, Rosa y Salomón que con su esfuerzo y dedicación, de manera directa o indirecta estuvieron apoyándome incondicionalmente en toda mi vida académica, como también a mis hermanos, Tannya, Geovanny y Cristian que con su apoyo, enseñanzas y cariño, fueron pilares fundamentales en mi vida personal como académica. Los amo mucho.

Nidia Mirella Siguenza Guaman

Esta tesis quiero dedicar a mi familia, especialmente a mis pilares que son mis padres, Francisco y Catalina, que siempre guiaron mis pasos y decisiones; agradecerles por su apoyo, confianza y amor incondicional que me brindaron durante todo este trayecto, hasta poder cumplir nuestro objetivo. De igual manera a mis hermanas, Gabriela y Pamela, que con su compañía y consejos, he podido seguir mi camino lleno de bendiciones. A mi esposo Daniel, quién me acompañó y me apoyó con mucho amor y respeto en esta etapa. Gracias por todo, los amo.

Marcela Estefanía Abril Vásquez



CAPITULO I: INTRODUCCIÓN

La presente investigación se fundamenta en la aplicación de herramientas de biología molecular para la detección específica de material genético de *Neospora caninum* (*N. caninum*), un parásito que ha adquirido gran importancia a nivel mundial por ser una de las principales causas de abortos en el ganado bovino.

En el Ecuador, específicamente en el sector interandino desde hace mucho tiempo se utiliza al perro como una gran herramienta para el pastoreo de animales de producción o como guardián de hatos y casas de las zonas rurales. La especie *Canis lupus familiaris* (perro) juega un papel importante en la trasmisión de una cierta cantidad de enfermedades a los bovinos, entre ellas la neosporosis, siendo el hospedador definitivo en el ciclo biológico del parásito, a más de esto sufre en sí mismo la enfermedad demostrando signos neuromusculares.

Para el diagnóstico de esta parasitosis, actualmente en nuestro país se utiliza como método diagnóstico preferencial ELISA en suero de bovino para confirmar los casos en dicha especie y en el perro el método de flotación es el aplicado como método coproparasitoscópico. En el área de la biología molecular podemos encontrar nuevas y diferentes técnicas para la detección de material genético de microorganismos, caracterizados por su alta sensibilidad y especificidad, que brinda mayor seguridad y facilidad al momento del diagnóstico.

Las técnicas de LAMP (Loop mediated isothermal Amplification, o Amplificación isotérmica mediada por un lazo) y PCR (Polymerase Chain Reaction o Reacción en cadena por la polimerasa) permiten la detección de manera directa de un patógeno, amplificando fragmentos específicos de ADN (Ácido desoxirribonucleico) (6). La sangre, tejido nervioso, muscular, líquido cefalorraquídeo y heces son las muestras más apropiadas para la detección de ADN de *N. caninum* en su hospedador definitivo y al comparar el porcentaje de inhibidores presentes en cada muestra, la sangre es la matriz que menor cantidad de éstos contiene, si es procesada correctamente solo existe el inhibidor hematina (7).

En nuestras condiciones no hay evidencias de la aplicación de estas dos técnicas moleculares como son PCR y LAMP para la detección de *N. caninum* en sangre periférica



Universidad de Cuenca

de perro, por lo cual, la finalidad de nuestro estudio es conocer cuál de estas dos técnicas es la más eficiente para el diagnóstico de esta enfermedad.

Objetivo general

Evaluar la aplicación de los métodos moleculares de PCR y LAMP para la identificación de ADN de *N. caninum* en muestras de sangre periférica de perros potencialmente expuesta a ésta parasitosis, para su posible uso como herramienta diagnóstica.

Objetivos específicos

Evaluar la aplicación del método de PCR en muestras de sangre periférica extraída de perros que se encuentren en granjas ganaderas bovinas que circundan la ciudad de Cuenca y que deambulan alrededor del Camal Municipal, para identificar *N. caninum*.

Evaluar la aplicación del método de LAMP en muestras de sangre periférica extraída de perros que se encuentren en granjas ganaderas bovinas que circundan la ciudad de Cuenca y que deambulan alrededor del Camal Municipal, para identificar *N. caninum*.

Comparar los resultados de la aplicación de PCR y LAMP en la detección de material genético de *N. caninum* en muestras de sangre extraída de perros que se encuentran en granjas ganaderas bovinas que circundan la ciudad de Cuenca y que deambulan alrededor del Camal Municipal.

Hipótesis

Las técnicas moleculares PCR y LAMP de manera similar son capaces de identificar material genético de *N. caninum* en sangre de perros expuestos a ésta parasitosis.



CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. GENERALIDADES

La neosporosis bovina es una enfermedad parasitaria de alto impacto tanto reproductivo como económico en granjas ganaderas ya sean de carne o leche; es producida por un protozoo llamado *Neospora caninum* (*N. caninum*), el cual origina alteraciones neuromusculares en perros que son los hospedadores definitivos y en los rumiantes principalmente en las vacas causa altos porcentajes de abortos y mortalidad neonatal (8).

N. caninum es un parásito intracelular obligado, que en su hospedador tanto definitivo como intermediario, el perro, capaz de producir parálisis y contracción ascendente hasta de las dos extremidades pélvicas; también pudiendo afectar a órganos vitales como el corazón, pulmones, placenta, cerebro, hígado, médula espinal entre otros (1).

Se ha descrito que existe mayor seroprevalencia de *N. caninum* en perros que conviven con vacas en haciendas ganaderas que en los que no tienen contacto con estas, indicando así una asociación epidemiológica entre el ganado bovino y los perros (4).

La mayor evacuación de ooquistes en las heces del hospedador definitivo contamina el agua de bebida, la hierba y alimentos de los animales susceptibles infectándose al ingerirlos (9), esto permite que se desarrolle el ciclo biológico del parásito ocasionando daños tisulares y consecuentemente pueda ser transmitido de forma horizontal o vertical a otros animales (10).

N. caninum tiene una distribución mundial, siendo diagnosticada en muchos países de los seis continentes(1).

2.2. ANTECEDENTES

La neosporosis canina se describió por primera vez en 1984 en Noruega manifestándose como una encefalopatía mortal en perros y ataxia en cachorros, que se pensaba estaba asociada a un parásito similar a *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) (11). En 1988, Estados Unidos se aisló un parásito diferente a *T. gondii* en 10 perros con signología de enfermedad neuromuscular. En 1987 en la ciudad de Nuevo México se asoció el aborto en las vacas con neosporosis bovina (1). El nuevo género *Neospora* fue descrito en el



año de 1988 junto con su única especie identificada *N. caninum*; para la cual Dubey obtuvo su primer aislado en cultivo celular y en el ratón a partir de muestras de cerebro y músculos de perro (11).

2.2.1 CICLO BIOLÓGICO

La enfermedad es producida por un protozoo formador de quistes, perteneciente al Phylum Apicomplexa de la Familia Sarcocystidae y del Género Neospora; del cual solamente una especie ha sido designada *N. caninum* (12).

N. caninum se caracteriza por un complejo ciclo de vida facultativo heteroxénico que involucra un hospedador definitivo (género Canis, incluido perros domésticos y salvajes) y una gama de hospederos intermedios (más comúnmente el ganado bovino) (16). Se presume, aunque no se ha demostrado, que la reproducción sexual ocurre en las células epiteliales intestinales del hospedero definitivo, lo que resulta en gametogenia, la singamia y la producción y excreción de ooquistas. La multiplicación asexual ocurre en el anfitrión intermedio (14), principalmente en el cerebro y médula espinal; como también pueden ubicarse en diversos órganos (15).

El ciclo de vida está tipificado por tres etapas infecciosas: taquizoitos, quistes tisulares y oocistos. Las etapas de taquizoitos y quistes tisulares se encuentran en los hospederos intermedios, estas formas parasitarias sobreviven intracelularmente. Los quistes tisulares son redondos u ovalados y se encuentran principalmente en el sistema nervioso central. Los tejidos extraneurales, especialmente los músculos, también pueden contener quistes tisulares (16).

Los perros que son infectados tanto de manera natural como experimentalmente, eliminan una pequeña cantidad de ooquistas, esta excreción de ooquistas comienza entre los 5 a 13 días posteriores al inicio de la infección y dura alrededor de 27 días. Los ooquistas esporulan en las heces de 24 a 72 horas después de su eliminación para convertirse en formas infectivas. Existe evidencia epidemiológica de que el ciclo de vida se puede mantener entre perros y ganado (17).

Las tres etapas infecciosas de *N. caninum* (taquizoitos, bradizoítos y oocistos) están involucradas en la transmisión del parásito. Es probable que los carnívoros se infecten al ingerir tejidos que contienen bradizoítos, y los herbívoros se infecten por la ingestión



de alimentos o agua potable contaminada por ooquistes esporulados de *N. caninum*. La infección transplacentaria puede ocurrir cuando los taquizoitos se transmiten de una madre infectada a su feto durante la gestación (18).

Los bradizoítos generalmente se encuentran dentro de los quistes de paredes gruesas, se replican lentamente y se cree que son una etapa quiescente y persisten dentro de los tejidos del hospedero intermedio. Durante la gestación, los bradizoítos se reactivan, se diferencian en taquizoitos y se diseminan a otros tejidos, incluido el útero, donde atraviesan la placenta e infectan al feto (14).

N. caninum no se considera zoonótica a pesar de algunas evidencias serológica de exposición humana, en especial en la población inmunosuprimida (13).

2.3. PERROS

2.3.1. SIGNOS CLÍNICOS

La neosporosis en los perros se manifiesta con mayor frecuencia como enfermedad neuromuscular, especialmente en los individuos jóvenes, pero los perros de cualquier edad pueden verse afectados.(13) Los signos clínicos que deben despertar sospecha de neosporosis incluyen paresia de las extremidades posteriores y ataxia que progresivamente son más graves, particularmente cuando hay pérdida de propiocepción y reflejos rotulianos (19). Para el diagnóstico la biopsia muscular es la más indicada y puede revelar inflamación no supurativa y la presencia de taquizoítos dentro de los miocitos (17).

Los signos neurológicos dependen del sitio parasitado en el SNC, las extremidades traseras suelen verse más afectadas que las extremidades anteriores; *N caninum* tiene predilección por las raíces lumbosacras en cachorros, resultando en la atrofia de las extremidades pélvicas, inmovilidad de las articulaciones (contracturas) y a menudo presentan una hiperextensión rígida (17). Los perros con parálisis de extremidades posteriores pueden estar alertas y sobrevivir durante meses. Otras disfunciones que ocurren incluyen, dificultad para tragar, parálisis de la mandíbula, flacidez muscular, atrofia muscular e incluso insuficiencia cardíaca (20).



Otros signos clínicos neurológicos informados son, la inclinación de la cabeza, ataxia, incontinencia, convulsiones y anomalías oculares incluyendo miosis, reflejos pupilares leves, anisocoria y enoftalmos. Las lesiones macroscópicas al momento de la necropsia se describen con poca frecuencia, aunque se ha observado atrofia cerebelosa en algunos casos (13). La incontinencia urinaria es inusual al principio de la enfermedad, puede desarrollarse de forma tardía (19).

2.3.2. TRANSMISIÓN

Cómo se infectan los perros con *N. caninum* en la naturaleza no se entiende completamente. Históricamente, la transmisión vertical de la neosporosis se reconoció por primera vez en perros. Hay evidencia de que una perra infectada transmite de manera congénita la infección a su progenie. En la mayoría de los casos de neosporosis neonatal, los signos clínicos no son evidentes hasta 5 a 7 semanas después del nacimiento. Estos datos sugieren que *N. caninum* se transmite desde la madre a los recién nacidos hacia las etapas terminales de gestación o de manera postnatal. La transmisión vertical de *N. caninum* en perros se considera altamente variable y no persiste en ausencia de infección horizontal (18). En estudios realizados, se ha observado que en una misma camada existen cachorros infectados que manifiestan de manera severa la patología; mientras que otros se mantienen saludables (21).

La única ruta probada de transmisión postnatal en el perro se da por la ingestión de ooquistes presentes en tejidos de animales infectados. Se estima que la cantidad máxima de ooquistes que un perro infectado puede excretar es de alrededor de 500,000 después de alimentarse de tejidos de un hospedero intermedio infectado (14).

En un informe, se encontró que el 51% de 300 perros de raza Foxhounds alimentados con cadáveres bovinos tenían anticuerpos *N. caninum*. Si bien el consumo de fetos bovinos abortados no parece ser una fuente importante de infección por *N. caninum*, el consumo de membranas fetales bovinas puede ser una fuente de *N. caninum* para perros. El parásito se ha encontrado en placenta naturalmente infectadas, y los perros alimentados con placenta de vacas seropositivas recién paridas pueden arrojar oocistos de *N. caninum*. Que los perros pueden adquirir el parásito al ingerir tejidos infectados ha



sido ampliamente demostrado, pero se desconoce si pueden infectarse por la ingestión de oocistos (17).

2.3.3. PATOGENIA

La patogenia de la neosporosis depende del equilibrio entre la capacidad del taquizoito para penetrar y multiplicarse dentro de las células, y el hospedero para impedir la proliferación del parásito. El proceso de invasión celular tiene dos pasos diferentes: la adhesión a la superficie de la célula hospedera y la penetración en la célula, que puede demorar no más de 5 minutos (22).

Ya en la célula, los taquizoitos se multiplican mediante endodiogonia en el interior de la vacuola parasitófora. Una célula puede albergar más de 100 taquizoitos, lo que llega a ocasionar su ruptura, lo taquizoitos salen al medio extracelular en donde iniciarán los procesos de adhesión e invasión de otras células que infectaran (4).

Se puede observar un período prepatente de 5-8 días después de la ingestión de quistes tisulares en la forma intestinal de la enfermedad, pero se sabe poco sobre la localización de los quistes en el órgano o sobre las estructuras afectadas. *N. caninum* puede inducir la producción lesiones necróticas, que son detectables en pocos días; causa la muerte celular por la multiplicación activa de los taquizoitos y puede inducir enfermedades neuromusculares en perros y otras especies mediante la destrucción de un gran número de células neuronales que afectan la conductibilidad del impulso nervioso entre las células (22).

Este parásito se puede encontrar en cualquier órgano, pero con mayor frecuencia éste se aloja en los cerebros de los animales; a pesar que la barrera hematoencefálica que está constituida por varios mecanismos tanto metabólicos como físicos que protegen al cerebro de agentes exógenos; sin embargo, el parásito supera estas barreras e infecta a las células gliales provocando un proceso de inmunosupresión durante la infección (23). Elsheikha *et al.* indicaron que el parásito puede crecer en células endoteliales microvasculares cerebrales (componente fundamental de la barrera hematoencefálica) sin perturbar marcadamente su proliferación normal o integridad mitocondrial; a su vez se observó la actividad de los taquizoitos al extenderse rápidamente para infectar tejidos



vecinos, indicando así que la barrera hematoencefálica favorece y apoya al crecimiento y proliferación de *N. caninum* (24).

2.3.4. DIAGNÓSTICO

La identificación del agente causal se puede desarrollar por medio de métodos directos e indirectos; siendo de gran importancia para su diagnóstico, prevención y control de la infección.

Los métodos directos consisten en la tipificación de oocistos, quistes tisulares o taquizoitos, mediante microscopía óptica, histopatología, inmunohistoquímica, cultivo celular *in vitro*, flotación fecal de heces de perro, y métodos moleculares, como PCR y LAMP. Y entre los métodos indirectos se cuenta con la prueba IFAT (Ensayo de inmunofluorescencia indirecta) y ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (18).

La tinción inmunohistoquímica fue una de las primeras técnicas utilizadas para diagnosticar la infección por *N. caninum*; esta técnica se usa a menudo para demostrar la presencia del parásito en las lesiones, particularmente en el cerebro y el corazón. Sin embargo, las técnicas de inmunohistoquímica han demostrado tener una sensibilidad relativamente baja y esto puede estar relacionado con un bajo número de parásitos y el grado de autolisis en los tejidos analizados (25).

Los ensayos serológicos como IFAT o ELISA pueden estar limitados por resultados falsos negativos en casos de infección temprana o crónica, la fluctuación de los anticuerpos específicos durante la infección limita los métodos serológicos porque dicha fluctuación a veces está por debajo de los límites de detección de las pruebas serológicas (26).

2.3.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los ensayos moleculares son útiles para la detección temprana de *N. caninum* en animales carentes de manifestaciones clínicas, la sangre como medio de transporte para los taquizoitos entre los tejidos corporales puede emplearse como una muestra biológica en la que se puede evidenciar la presencia del parásito (26).



El diagnóstico de neosporosis ha mejorado con el desarrollo de pruebas como PCR que permiten una identificación rápida, precisa, confiable y muy sensible del parásito a través de la amplificación y la posterior demostración de secuencias de ADN específicas del parásito (27). PCR logra amplificar secuencias a partir de proporciones ínfimas de ADN diana, inclusive a partir de ADN de una sola célula. Siendo posible detectar ADN del parásito en leucocitos, linfocitos y sangre, lo cual demuestra la presencia del parásito de manera directa (28).

La PCR tienen la ventaja de poder amplificar pequeñas cantidades de ADN diana del parásito en diferentes tipos de muestras biológicas, los ensayos de PCR pueden estar dirigidos a amplificar diferentes genes o secuencias diana; por ejemplo, la secuencia repetida de *N. caninum* llamada Nc-5 y la secuencia del espaciador interno del transcripto de los ARN ribosomales 18S y 5.8S (ITS1) son los más utilizados. Recientemente se han desarrollado diferentes formatos de PCR para aumentar la sensibilidad en la detección del ADN de *N. caninum*, por ejemplo, la PCR anidada, semi-anidada y en tiempo real. Sin embargo, el diagnóstico por PCR implica el uso de equipos sofisticados, como un termociclador para amplificar ácidos nucleicos, así como también la necesidad de personal capacitado en dicha área y tiempo adicional para detectar los productos amplificados cuando se emplea la PCR convencional (25).

2.3.4.2. Técnica de Amplificación Isotérmica mediada por bucle o lazo (LAMP)

LAMP es una novedosa técnica molecular de amplificación de ácidos nucleicos donde un conjunto de cuatro (o seis) primer u oligonucleótidos diferentes que hibridan en seis (u ocho) regiones diferentes en la secuencia diana, lo que lo hace altamente específico. Este conjunto de primer consta de dos primer externos (F3 y B3), dos primer internos (cebador interno sentido (FIP) y cebador interno reverso (BIP) y primer de bucle (bucle sentido y bucle reverso). La reacción de LAMP puede realizarse simplemente en una condición isotérmica mediante el uso de la ADN polimerasa *Bst*, o similares, que tienen una actividad de desplazamiento de la cadena de ADN (6).

Se ha demostrado que LAMP es entre 10 a 100 veces más sensible a nivel analítico que la PCR convencional (6). Esta técnica ha llamado mucho la atención por su rápida, precisa y rentable detección de microorganismos como virus, bacterias y parásitos



patógenos. Al igual que muchos patógenos de plantas como en el caso de hongos (29). Incluso cuando hay poco ADN disponible. Es también una herramienta valiosa y beneficiosa en países en desarrollo debido a su desempeño sin la necesidad de contar con equipos avanzados o expertos para operarlo (30)

La detección visual inmediata de resultados positivos y el uso de dispositivos de calefacción básicos hacen que este método sea simple de usar en el campo, este ensayo ha sido validado en muestras de perros y tiene el potencial de lograr la detección rápida de *N. caninum*. Un mayor desarrollo, modificación, validación y estandarización del ensayo proporcionará una herramienta para el diagnóstico, la comprensión de la epidemiología para el control y diseño de estrategias de prevención para la neosporosis canina (26).

2.4. BOVINOS

La neosporosis bovina, neosporosis fetal o neosporosis abortiva, es de importancia mundial dentro de la explotación bovina. Esta enfermedad parasitaria es muy común en las ganaderías, tiene un efecto negativo dentro de la reproducción, principalmente afecta a hembras gestantes y a terneras recién nacidas, varios estudios sugieren una posible transmisión venérea ya que se ha detectado ADN de *N. caninum* tanto en semen fresco y congelado aunque en bajas cantidades (10).

En los bovinos, siendo uno de los hospederos intermediarios, se da lugar a dos estadios: los taquizoitos y los bradizoítos. Los taquizoitos infectan y se multiplican en diferentes tipos de células como son de las neuronas, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, hepatocitos y células renales, y atacan al feto por vía transplacentaria (31).

El único signo clínico observado en vacas infectadas por *N. caninum* es el aborto, presentando fetos momificados o autolisados. El tiempo al que se presenta los abortos fluctúa entre los 3 a 8 meses de gestación, mostrando mayor probabilidad de que éste suceda entre los 4 a 6 meses (32).

En los animales que nacen vivos pero congénitamente infectados presentan signología nerviosa visible a los 5 días posteriores al parto aproximadamente o pueden aplazarse hasta las 2 semanas de vida. Mostrando alteraciones neuromusculares desde la



debilidad y dificultad de levantarse, incoordinación ligera de miembros, ataxia, hasta una parálisis total. Como también se puede ver afectado células nerviosas embrionarias presentando exoftalmia y posición asimétrica de los ojos (11).

2.5. OTRAS ESPECIES

La neosporosis se ha vinculado con casos de abortos esporádicos en cabras y ovejas. Como también se ha reportado como causa de abortos en equinos y camélidos; se conoce que la infección subclínica por *N. caninum* en los caballos es relativamente común. Además en estudios se ha detectado ADN de *N. caninum* en el zorro colorado, mapache, antílope, rata, ratón, aunque no se ha podido aislar al parásito en forma viable (33).

Se considera que la neosporosis es potencialmente zoonótica ya que experimentalmente se ha infectado a dos monos Rhesus, sin embargo aún no existe evidencia contundente de infección en humanos, ya que se podría diagnosticar de manera errónea como toxoplasmosis (6). Existen estudios que evidencia muestras positivas serológicamente mediante ELISA, IFAT y Western blot, de pacientes afectados VIH con signos neurológicos o con factores predisponentes como es el vínculo directo con producciones bovinas y contacto con perros en zonas rurales (34).

2.6. FACTOR DE RIESGO DE PERROS PARASITADOS PRESENTES EN LAS FINCAS

El factor de riesgo principal en las haciendas ganaderas es el manejo sanitario incorrecto de material biológico resultante de abortos y partos de las hembras bovinas, por parte de los ganaderos o administradores de las granjas (35).

Los hábitos específicos de alimentación de los perros de granja, como permitir la alimentación con fetos abortados y placenta puede aumentar la probabilidad de seropositividad en el ganado. Las diferencias en el manejo de la finca (alimentación, manejo de pastura, densidad de ganado y vivienda) pueden tener influencia en el riesgo de infección (36).



2.7. MEDIDAS DE CONTROL

Se debe evitar que los perros contaminen el alimento y el agua de los bovinos con heces y que los perros se alimenten con placenta bovina u otros tejidos que puedan contener quistes de este parásito y vigilar la presencia de roedores (37). Se debe evitar también el contacto con tejidos infectados de otros hospedadores intermediarios, por ejemplo, ovejas, cabras, caballos o heces de otros cánidos domésticos y silvestres (22).

No hay indicativos de agentes quimioterápicos efectivos que pueden ser usados para prevenir la transmisión vertical de la neosporosis y a pesar de los avances inmunobioquímicos en el estudios de *N. caninum*, aún no se ha elaborado una vacuna eficaz para la prevención de la enfermedad (37).

Un inconveniente importante al diseñar una vacuna contra *N. caninum* es que la respuesta inmune en sí misma es potencialmente dañina para el feto. La investigación de vacunas ha estado en marcha durante mucho tiempo, y la mayoría de los enfoques se han centrado en vacunas con parásitos inactivados (taquizoitos muertos), el uso de subunidades basadas en antígenos nativos (vacunas de extractos de taquizoítos formulada con un adyuvante de lecitina de soja / β -glucano) y antígenos de *N. caninum* recombinantes y parásitos vivos atenuados naturalmente (22).



CAPITULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio y unidad de análisis

Las muestras fueron tomadas de animales residentes de las zonas ganaderas aledañas a la ciudad de Cuenca y cercanas al camal municipal de Cuenca-Azuay. La muestra de sangre fue tomada de 100 perros, que se encontraban en contacto directo con bovinos y/o estaban expuestos al consumo de restos de estos animales y seleccionados sin distinción de raza, edad o sexo.

3.2. Recolección y transporte de muestras

3.2.1. Materiales de trabajo

Mandil

Guantes de látex descartables

Mascarillas

Torniquete

Gorros

Marcador rotulador de muestras

Tubos con anticoagulante (EDTA)

Rasuradora

Tijeras

Torundas de algodón

Jeringas de 5 ml

Gel refrigerante

Cooler

3.2.2. Materiales químicos

Alcohol etílico al 70%

3.2.3. Procedimiento

Paso 1. Se tomó 1ml de sangre de cada perro de la vena cefálica con una jeringa de 5 ml y aguja hipodérmicas de calibre 22 y fue colocada en los tubos con anticoagulante (EDTA).

Paso 2. Para el transporte se utilizó un cooler con gel refrigerante que dio a la muestra un tiempo máximo de 8 horas para su correcta conservación.



Paso 3. Estas muestras se trasladaron al laboratorio Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca en donde se conservaron a temperaturas de refrigeración (4 °C) por un periodo máximo de una semana, hasta su posterior procesamiento.

3.3. Extracción de ADN

El ADN se extrajo utilizando el método tradicional de Fenol/Cloroformo descrito por Ghaheri *et al.* (38) para sangre total.

3.3.1. Materiales biológicos

Sangre completa

3.3.2. Soluciones

Buffer de lisis (40 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM de NaCl, 8 mM de EDTA, 2% de SDS (Sigma, No. cat.: T4661, 320331, 53014, EDS y 71725)).

Proteinasa K (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM de EDTA, 50% de Glicerol, 5 mg/ml de proteinasa K (Sigma, No. cat.: T4661, 320331, EDS; G5516 y Fisher bioReagents, Cat. no: BP1700)).

Fenol/Cloroformo/A isoamílico 25:24:1 (Sigma, No. cat.: 77619).

Etanol absoluto (Sigma, No. cat.: E7148).

Solución de Etanol al 70% (Sigma, No. cat.: E7148 y W4502).

3.3.3. Equipos

Centrifuga

Vortex

Baño María o bloque de calentamiento

Refrigeradora

3.3.4. Proceso para la extracción de ADN de muestras de sangre completa

Paso 1. Se tomó 200 µl de sangre completa y se le agregó 200 µl de la solución Buffer de lisis y 40 µl de la solución de Proteinasa K, para tener total de 440 µl.

Paso 2. Ésta mezcla se colocó a Baño María por 12 a 14 h a una temperatura de 56 °C, posteriormente se le agregó 440 µl de la Solución de Fenol/Cloroformo/A isoamílico 25:24:1 y fueron mezcladas con la ayuda de un vortex por 10 a 15 s.



Paso 3. La mezcla fue centrifugada a 14,000 x g por 10 min, posterior a lo anterior se observó que la solución se separó en dos partes, la inferior que corresponde a la mezcla de solventes y la superior acuosa.

Paso 4. Se tomó 350 µl de la parte acuosa o sobrenadante y se colocó en un tubo nuevo, al cual se le agregó 875 µl de Etanol absoluto frío (4 °C).

Paso 5. Ambas soluciones se mezclaron por inversión y se sometieron a centrifugación a 14,000 x g por 10 min para formar la pastilla de los ácidos nucleicos totales, posterior a la centrifugación se decantó el sobrenadante.

Paso 6. Al precipitado o pastillas del tubo se le agregó 500 µl de la Solución de Etanol al 70% fría (4 °C), se lavó la superficie del tubo por inversión y posteriormente se volvió a centrifugar en las condiciones arriba descritas.

Paso 7. El sobrenadante se decantó nuevamente y el precipitado con el ADN total se dejó secar a temperatura ambiente durante 12-14 h protegido del polvo y la luz directa.

3.4. Amplificación de control del proceso de ADN total de las muestras de sangre.

3.4.1. Materiales biológicos

ADN total extraído de las muestras de sangre.

3.4.2. Soluciones

Agua grado biología molecular.

Enzima *Taq* ADN polimerasa, con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución de 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen, No. cat.: 10966-030).

Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191)

Solución del oligonucleótido DOGCyB-For (GGAGTATGCTTGATTCTACAG) (Invitrogen) a 100 µM.

Solución del oligonucleótido DOGCyB-Rev (AGAAGTGGAAATGAATGCC) (Invitrogen) a 100 µM.

3.4.3. Equipos

Centrifuga

Termociclador

Vortex

Cámara de electroforesis



Fuente de poder

Refrigeradora

Congelador

Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas

Incubadora a 55 °C

3.4.4. Procedimiento para la amplificación de control del proceso de ADN total de las muestras de sangre

Paso 1. Se añadió 30 µl de Agua grado biología molecular al precipitado de ADN total obtenido en el paso 7 del procedimiento de la extracción de ADN total y se incubó a 55 °C por 10 min, posteriormente se mezclaron las soluciones en el vortex y se centrifugaron para colectar en el fondo del tubo las soluciones de las muestras de ADN total resuspendido en el agua.

Paso 2. En un tubo de tamaño adecuado, adicionamos los siguientes reactivos para preparar la premezcla de las reacciones de PCR:

Reactivos:	Concentración:	Volumen*:	Concentración final:
Agua grado biología molecular	No aplica.	90.75 µl	No aplica.
Buffer de PCR	10 X	12.5 µl	1X
dNTP's	10 mM c/u	1.35 µl	0.2 mM c/u
MgCl ₂	50 mM	5 µl	1.5 mM
Oligonucleotido DOGCyB-F	100 µM	1 µl	0.8 µM
Oligonucleotido DOGCyB-R	100 µM	1 µl	0.8 µM
Enzima Taq DNA polimerasa	5 U/µl	1 µl	0.05 U/µl
Volumen final	-----	112.5 µl	-----

* Para 12.5 muestras.

Paso 3. Se colocó 9 µl de la premezcla en un tubo de PCR (0.2 ml) y se le adicionó 1 µl de la solución con el ADN total de la muestra correspondiente, en el ensayo se incluyó un control negativo (premezcla más agua destilada).

Paso 4. Los tubos de PCR con las reacciones de amplificación (10 µl) se colocaron en el termociclador y fueron sometidos al siguiente perfil de temperatura para generar los amplicones o productos de PCR del control de proceso.

Etapa:	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Temperatura	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C



Tiempo 5 min 50 s 25 s 45 s 5 min

*Almacenamiento: 4°C

Paso 5. Una vez concluido el proceso de amplificación, a cada uno de los tubos se le añadió 3 µl de la Solución Buffer de carga de ADN 6X, se centrifugaron para juntar ambas soluciones, se mezclaron en el vortex y fueron sometidos a electroforesis en gel al 1.2 % de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio (0.3 mg/ml).

3.5. Detección por electroforesis de los amplicones en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio

3.5.1. Materiales biológicos

Amplicones o productos de PCR.

3.5.2. Materiales químicos y reactivos

Agarosa (Invitrogen, No. cat.: 16500-500).

Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, No. cat.: T4661, A6283, EDS, S8045).

Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma, No. cat.: E7637).

Solución Buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM de EDTA, pH 8.0, 0.3% de Azul de bromofenol, 0.3% de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma, No. cat.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516).

Solución con el marcador de peso molecular de ADN (100 bp DNA ladder, Invitrogen, No. cta.: 15628050).

3.5.3. Materiales de laboratorio y equipos

Micropipetas (10, 100 y 1000 µl)

Puntas para las micropipetas

Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes

Tubos de PCR

Vortex

Cámara de electroforesis horizontal

Horno de microondas

Balanza analítica

Potenciómetro (pHmetro)

Transiluminador



Fotodocumentador

Computadora de escritorio

3.5.4. Procedimiento de electroforesis de los amplicones en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio

Paso 1. Se pesó 1.08 g de agarosa y se adicionó a un matraz Erlenmeyer con 90 ml de Solución buffer TAE 1X, la agarosa se disolvió por calor con ayuda de un horno de microondas.

Paso 2. Una vez disuelta completamente la agarosa en la solución TAE se dejó enfriar y se adicionó 3 µl de una Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml. Se mezcló completamente, y la mezcla se vació en el molde para el gel y se colocó inmediatamente dos peines para formar dos filas de pozos.

Paso 3. Una vez gelificada la solución de agarosa, el gel se colocó en la cámara de electroforesis horizontal y se adicionó la cantidad de Solución buffer TAE 1X necesaria para cubrir completamente el gel.

Paso 4. Posteriormente se cargaron los 13 µl (10 µl de la reacción de PCR más 3 µl de la Solución buffer de carga para ADN 6X) de cada una de las muestras en cada pocillo del gel, y en un de los pocillos de cada fila se colocó 6 µl del marcador de peso molecular de ADN (500 ng totales).

Paso 5. Concluido el cargado de las muestras y el marcador de peso, se colocó la tapa de la cámara de electroforesis y se conectó a la corriente eléctrica a un voltaje de 90 por 30 a 45 min.

Paso 6. Una vez separado o resueltos los productos de PCR, se visualizaron en el transiluminador y con ayuda del fotodocumentador se tomó una imagen del mismo.

Paso 7. Se consideró como una amplificación positiva la observación de una banda de aproximadamente 808 bp.

Todas las muestras (positivas) validadas con este ensayo fueron sometidas a la detección de material genético de *N. caninum* tanto mediante el ensayo de PCR como LAMP.



3.6. Amplificación del producto de PCR del patógeno (*N. caninum*)

3.6.1. Material biológico

Muestras de ADN total (Validadas con el control de proceso).

3.6.2. Materiales químicos y reactivos

Enzima *Taq* ADN polimerasa, con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución de 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen, No. cat.: 10966-030).

Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, No. cat.: R0191).

Solución del oligonucleotido NcaNp21-For (CAGTCAACCTACGTCTTCT) (Invitrogen) a 100 µM.

Solución del oligonucleotido NcaNp6-Rev (GTGCGTCCAATCCTGTAAC) (Invitrogen) a 100 µM.

Agua grado biología molecular (Sigma, No. cat.: W4502).

3.6.3. Materiales de laboratorio y equipos

Micropipetas (10, 100 y 1000 µl).

Puntas para las micropipetas.

Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes.

Tubos de PCR.

Vortex.

Microcentrífuga.

Termociclador.

3.6.4. Procedimiento para amplificación del producto de PCR del patógeno (*N. caninum*)

Paso 1. En un tubo de tamaño adecuado se adicionaron los volúmenes necesarios de cada uno de los siguientes reactivos para preparar la premezcla que se requirió para el número de muestras a ensayar, de acuerdo a lo siguiente:

Reactivos:	Concentración:	Volumen:	Concentración final:
Agua grado biología molecular.	No aplica.	89.5 µl	No aplica.
Buffer de PCR.	10 X	12.5 µl	1X
dNTP's	10 mM c/u	2.55 µl	0.2 mM c/u
MgCl ₂	50 mM	5 µl	2 mM
Oligo F NcaNp21-For	100 µM	1 µl	0.8 µM
Oligo R NcaNp6-Rev	100 µM	1 µl	0.8 µM
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa	5 U/µl	1 µl	0.04 U/µl



Volumen final

112.5 μ l

* Para 12.5 muestras.

Paso 2. La premezcla anterior se colocó en un tubo de PCR (9 μ l) y se adicionó 1 μ l de la muestra de ADN total correspondiente. Se añadió al ensayo un control negativo (Agua grado biología molecular y uno positivo (ADN total de *N. caninum*).

Paso 3. Las reacciones de PCR preparadas se colocaron en el termociclador para iniciar el proceso de amplificación de acuerdo al siguiente perfil de temperatura programado.

Etapa:	Desnaturalización inicial	35 ciclos			Extensión final
		Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Temperatura	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C
Tiempo	5 min	30 s	25 s	45 s	5 min

*Almacenamiento: 4 °C

Paso 4. Una vez concluido el proceso de amplificación, a cada uno de los tubos se les adicionó 3 μ l de la Solución buffer de carga de ADN 6X, se centrifugaron y mezclaron en el vortex. Estas muestras fueron sometidas a electroforesis en gel al 1.2% de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio de acuerdo a lo descrito en la sección 3.5, siguiendo los pasos descritos (Sección 3.5.4).

Se consideró una amplificación positiva la detección de un producto de PCR de aproximadamente 328 bp.

3.7. Amplificación del ADN de *N. caninum* mediante el ensayo LAMP

3.7.1. Materiales biológicos

ADN total extraído de las muestras de sangre.

3.7.2. Materiales químicos o reactivos

Agua grado biología molecular (Sigma, No. cat.: W4502).

Buffer de amplificación 10X (20 mM de Tris-HCl, pH 8.8; 10 mM de (NH4)2SO4; 10 mM de KCl; 2 mM de MgSO4 y 0.1% de Triton X-100) y enzima Bsm ADN polimerasa (Thermo scientific, No. cat.: EP0691).

Solución de Betaína 4 M (Sigma, No. cat.: 61962-50G).

Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191).



Universidad de Cuenca

Solución del oligonucleotido FIP (F1c + F2) (ACAGCCAAACACAACCCGACTCCATGAGGCCGGAGAATGAGA) (Invitrogen) a 100 µM.

Solución del oligonucleotido BIP (B1c + B2) (AAGGACAGGGTTGGGTATCGCGATGCCGCTCCTGAAGTC) (Invitrogen) a 100 µM

Solución del oligonucleotido F3 (GGCTTCATGCGAGGTCTC) (Invitrogen) a 25 µM

Solución del oligonucleotido B3 (TCAGTGAGCGATGTCCTCC) (Invitrogen) a 25 µM

Solución del oligonucleotido LF (GAAGGAAGACACCTGGAAATCG) (Invitrogen) a 100 µM

Solución del oligonucleotido LB (GGAGCTGGTTGCTGTGCTC) (Invitrogen) a 100 µM

3.7.3. Materiales de laboratorio y equipos

Termociclador y/o baño María

Tubos de PCR

Set de micropipetas (1 ml, 200 µl y 20 µl con puntas estériles)

3.7.4. Procedimiento de la amplificación de ADN de *N. caninum* mediante el ensayo de LAMP

Paso 1. Previo a realizar el ensayo de amplificación LAMP se procedió a realizar un control de proceso utilizando el ensayo PCR, para detectar ADN total, esto con el objetivo de validar que el protocolo de extracción de ADN de la sangre fue adecuado, utilizando oligonucleótidos específicos para el perro y los otros reactivos antes mencionados (Sección 3.4.4, paso 2), y se siguió los pasos para la amplificación del control de proceso detallado anteriormente (Sección 3.4.4, paso 1 al 5)

Paso 2. Posteriormente se realizó una premezcla para el ensayo de amplificación LAMP para detección de ADN de *N. caninum* con todos los reactivos antes descritos (Sección 3.7.2) con el volumen requerido para el número de muestras a analizar (10 µl de volumen final por reacción) colocando en el siguiente orden los reactivos exceptuando las muestras de ADN total:

Reactivos:	Concentración		Volumen de la premezcla:
	inicial:	final:	



Universidad de Cuenca

Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	58.5 μ l
Buffer de amplificación 10X	10X	1X	12.5 μ l
dNTP's	10 mM	1.4 mM	3.5 μ l
Oligonucleótido FIP	100 μ M	1.6 μ M	2 μ l
Oligonucleótido BIP	100 μ M	1.6 μ M	2 μ l
Oligonucleótido F3	25 μ M	0.2 μ M	1 μ l
Oligonucleótido B3	25 μ M	0.2 μ M	1 μ l
Oligonucleótido LF	100 μ M	0.8 μ M	1 μ l
Oligonucleótido LB	100 μ M	0.8 μ M	1 μ l
Betaina	4 M	800 mM	25 μ l
Volumen final	-----	-----	107.5 μ l

Paso 3. La premezcla preparada se llevó al vortex por 4 a 6 s, y fue colectada por centrifugación a 14,000 x g durante 15 a 20 s.

Paso 4. Se marcaron los tubos de PCR (200 μ l) y se les colocó 8.6 μ l de la premezcla y se les adicionó 1 μ l de la muestra de ADN total correspondiente.

Paso 5. Los tubos con las reacciones de amplificación (9.6 μ l) se colocaron en el termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la desnaturización del ADN total y el alineamiento de los oligonucleotidos a la secuencia diana de *N. caninum* a amplificar:

Paso:	Desnaturalización:	Alineamiento:
Tiempo:	5 min	5 min
Temperatura:	94 °C	4 °C

Paso 6. Culminado este tiempo incubación, se sacaron los tubos de PCR con las reacciones (200 μ l) del termociclador y se añadió la enzima *Bsm* ADN polimerasa para que se suceda la amplificación del material genético:

Reactivos:	Concentración		Volumen por reacción:
	inicial:	final:	
Enzima <i>Bsm</i> ADN polimerasa	8 U/ μ l	0.32 U/ μ l	0.4 μ l
Volumen final:	-----	-----	10 μ l

Paso 7. Posteriormente se sometió esta mezcla al proceso de extensión e inactivación



Universidad de Cuenca

en el termociclador o en el baño María.

Paso:	Extensión:	Inactivación:
Tiempo:	60 min	10 min
Temperatura:	60 °C	80 °C

3.8. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio

3.8.1. Materiales biológicos

Productos amplificados mediante el ensayo de LAMP

3.8.2. Materiales químicos y reactivos

Agarosa (Invitrogen, Cat. no.: 16500-500)

Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, Cat. no.: T4661, A6283, EDS, S8045)

Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma, Cat. no.: E7637)

Solución Buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM de EDTA, pH 8.0, 0.3% de Azul de bromofenol, 0.3% de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma, Cat. no.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516)

Solución con el marcador de peso molecular de ADN (Invitrogen, Cat no: 15628050)

3.8.3. Materiales de laboratorio y equipos

Micropipetas (10, 100 y 1000 µl)

Puntas para las micropipetas

Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes

Tubos de PCR

Vortex

Cámara de electroforesis horizontal

Horno de microondas

Balanza analítica

Potenciómetro (pHmetro)

Transiluminador

Fotodocumentador

Computadora de escritorio



3.8.4. Procedimiento de la detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel al 1.5% de agarosa-TAE teñido con Bromuro de etidio

Para la detección de los productos amplificados mediante electroforesis del ensayo LAMP se utilizó el mismo procedimiento descrito en la sección 3.5.4; difiriendo en la concentración del gel, en éste caso al 1.5%.

En el caso del ensayo LAMP se consideró muestra positiva aquella en la que se observó el patrón de segmentos de ADN multimérico de *N. caninum* amplificado.

3.9. Análisis estadístico.

Con los resultados obtenidos de los ensayos de PCR y LAMP aplicados a las 100 muestras de sangre de perros para la detección de *N. caninum*, mediante el programa SPSS se realizó el cálculo de frecuencias acumulada y porcentajes. Para la comparación de ambos ensayos se utilizaron tablas de contingencia (Chi-cuadrado y F-Fisher).



CAPITULO IV: RESULTADOS

4.1. Ubicación geográfica mediante coordenadas de las muestras tomadas

Durante el proceso de colecta de muestras de sangre periférica de perros, se logró obtener un total de 100 muestras de animales residentes en parroquias rurales cercanas a la ciudad de Cuenca y la zona del camal municipal de ésta misma ciudad (**Figura 1** y **Anexo 1**).

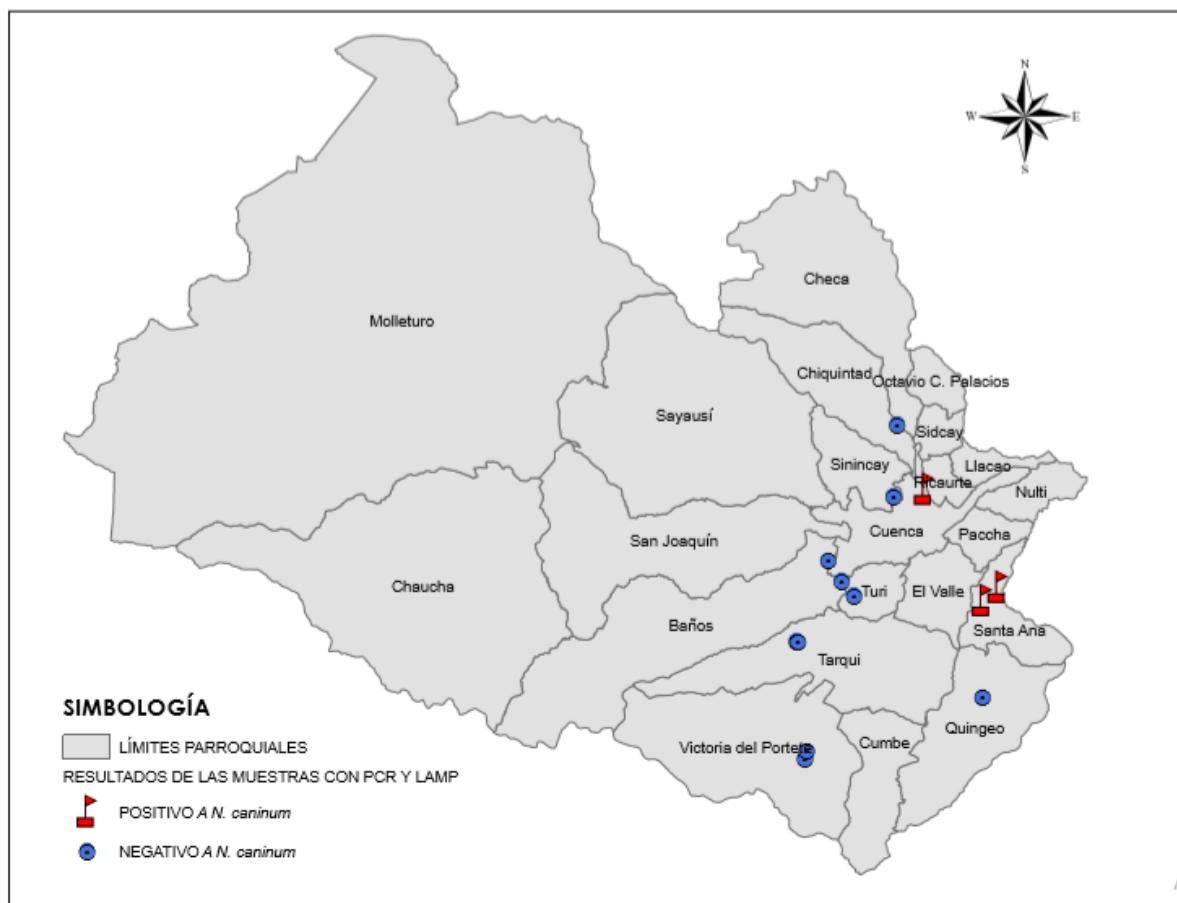


Figura 1. Mapa de parroquias rurales de Cuenca y ubicación geográfica mediante coordenadas de las muestras tomadas.

4.2. Ensayo de PCR del control de proceso

Al concluir la extracción de ADN de las 100 muestras de sangre periférica de perros tomadas en las zonas ganaderas aledañas a la ciudad de Cuenca indicadas en la **Figura 1**, se realizó un control de proceso para determinar si las muestras de ADN total eran



Universidad de Cuenca

viables o no para los ensayos de amplificación y detección de material genético de *N. caninum*; como resultado obtuvimos en un primer intento 97 muestras positivas o validadas y en el segundo intento las 3 restantes. Como ejemplo de lo observado en los ensayos de amplificación del control de proceso se muestra una imagen de una electroforesis en gel de agarosa, en todas las muestras evaluadas se observa un producto de aproximadamente 808 bp que corresponde al ADN de perro pero no así en la muestra correspondiente al control negativo (Ver **Figura 2**).

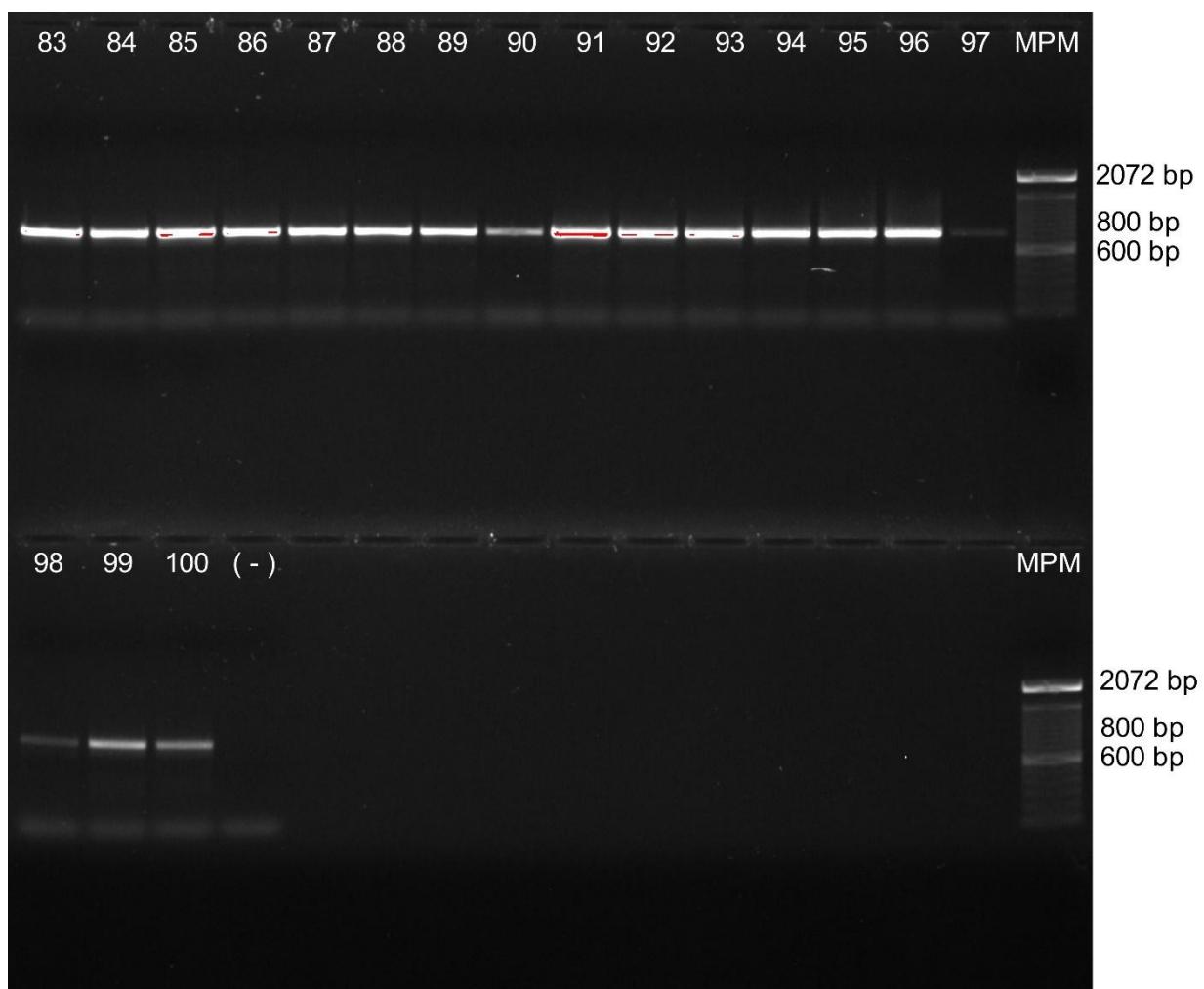


Figura 2. Productos de amplificación de la PCR del control de proceso.

Carriles del 1-24: Amplicones de las muestras de ADN total extraído de sangre total, tamaño del amplicón de 808 bp; Carril (-), control negativo de la reacción de PCR y Carril MPM, Marcador de peso molecular de 100 bp, las bandas más intensas corresponden a 600 bp y 2,072 bp.



4.3. Ensayo de PCR para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de sangre total

Con todas las muestras de ADN total validadas se realizó un ensayo de PCR para la detección de ADN de *N. caninum* en las muestras de sangre de perro, dándonos como resultado 2 muestras positivas (2%), como se puede observar en el ejemplo mostrado en la **Figura 3**, en ella se muestra la presencia de un producto de PCR de aproximadamente 320 bp, tamaño similar al observado en el control positivo.

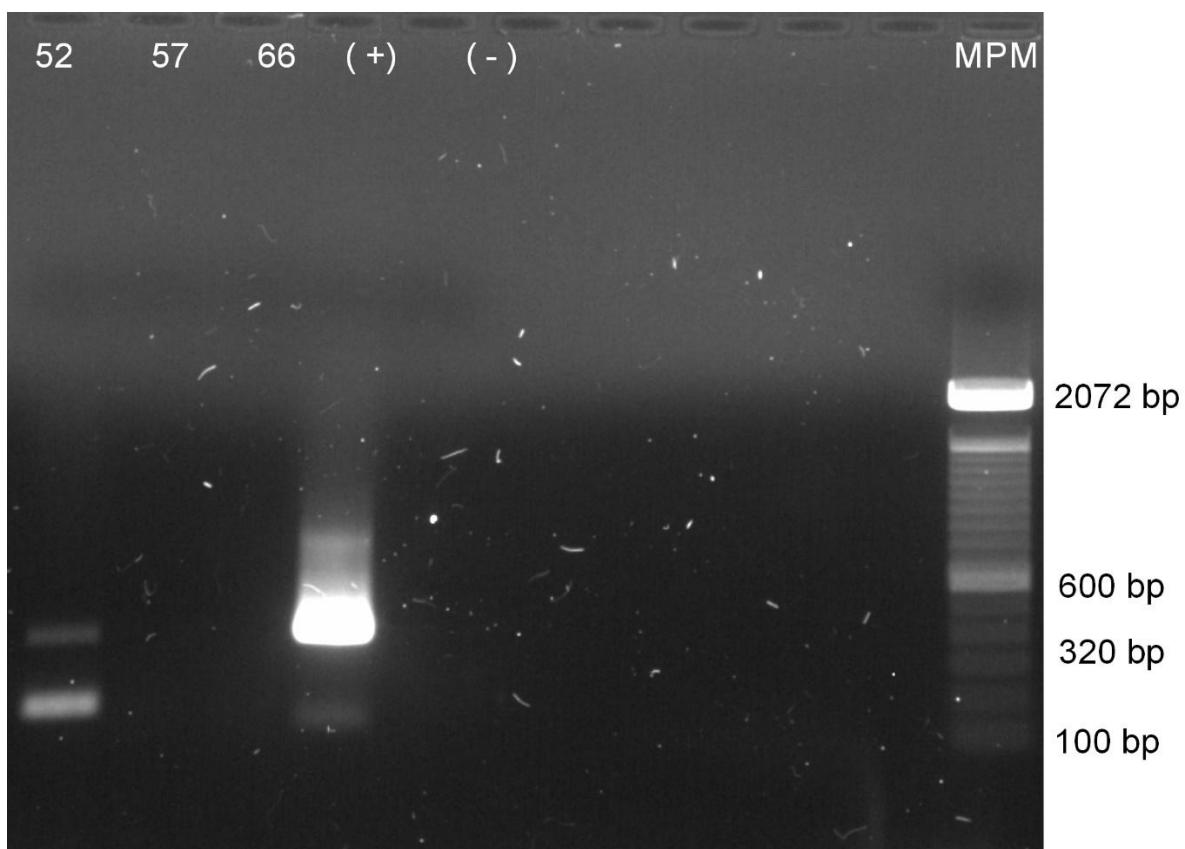


Figura 3. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos en los ensayos para la detección de material genético de *N. caninum* en muestras de sangre total.

Carril 52, muestra positiva a la detección de ADN de *N. caninum*; Carriles 57 y 66, muestras negativas; Carril (+), Control positivo; Carril (-): Control negativo y Carril MPM: Marcador de peso molecular de 100 bp, la bandas más intensa corresponden a 600 bp y 2,072 bp.



4.4. Ensayo de LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de sangre total

De la misma forma se realizó un ensayo de LAMP para la amplificación de ADN de *N. caninum* en las 100 muestras de sangre de perro, como resultado se encontró 3 muestras positivas. En la **Figura 3** se observa como ejemplo dos muestras (Muestra 52 y 57) de las 3 positivas, junto a una muestra negativa y los respectivos controles positivo y negativo.

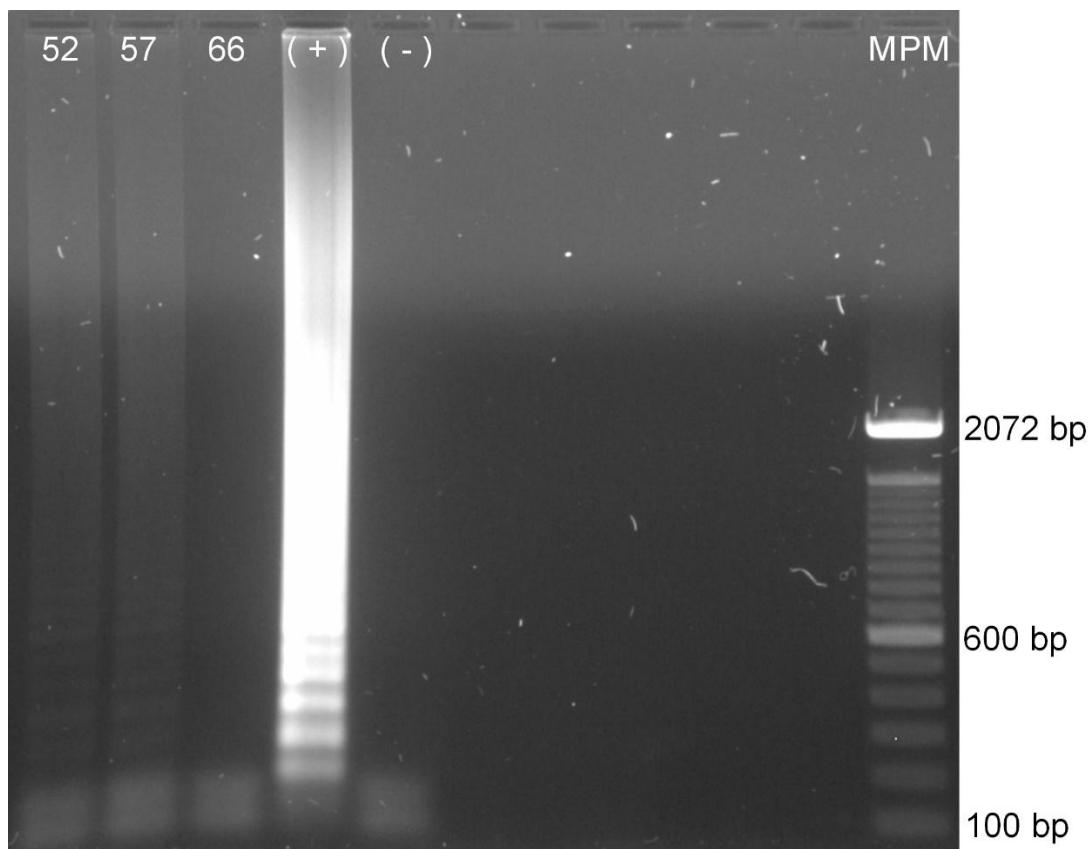


Figura 4. Electroforesis de los productos de amplificación de ADN de *N. caninum* mediante el ensayo LAMP.

Carriles 52 y 57: Muestras positivas; Carril 66, Muestra negativa; Carril (+), Control positivo; Carril (-): Control negativo y Carril MPM: Marcador de peso molecular de 100 bp, las bandas más intensas corresponden a 600 bp y 2,072 bp.



4.5. Comparación de los ensayos de PCR y LAMP mediante tablas de contingencia.

De acuerdo a la distribución de los resultados obtenidos con la aplicación de los ensayos de PCR y LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las 100 muestras de sangre total de perros residentes en parroquias rurales cercanas a la ciudad de Cuenca y en la zona aledaña al camal municipal de la misma ciudad, los resultados del análisis estadístico con las tablas de contingencia muestran que no es posible rechazar la hipótesis planteada ($p = 0.651$ y 0.500 , respectivamente); ambas técnicas moleculares muestran una capacidad similar para detectar material genético de *N. caninum*. (Tabla 1)

Tabla 1. Distribución de los resultados obtenidos con la aplicación de los ensayos de PCR y LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en 100 muestras de sangre total de perros.

Ensayo / Resultado:		PCR		Total:	Chi-cuadrado	F-Fisher
		Positivo	Negativo			
LAMP	Positivo	1 (1%)	2 (2%)	3 (3%)	0.651	0.5
	Negativo	1 (1%)	96 (96%)	97 (97%)		
Total		2 (2%)	98 (98%)	100 (100%)		



CAPITULO V: DISCUSIÓN

Los perros que habitan en las granjas en zonas ganaderas son considerados el factor más importante para completar el ciclo biológico y favorecer la propagación de la neosporosis (26), ya que al convivir muy de cerca con el ganado bovino están propensos a infectarse mediante la ingestión de restos biológicos que contienen *N. caninum*, pueden también propagar la infección a otros animales contaminando los pastos, concentrados y agua de bebida mediante la liberación de ooquistes en las heces, que pueden llegar a ser alrededor de 500,000 cada vez que defecan.

En un estudio realizado en la provincia de Pichincha en la que se tomaron muestras sanguíneas tanto de perros como de vacas para el diagnóstico de *N. caninum* mediante inmunofluorescencia indirecta se determinó que existe una mayor frecuencia de la enfermedad en haciendas ganaderas que tienen perros comparado con las haciendas que están libres de estos (38). En la misma provincia en el año 2013 se reportaron casos positivos a *N. caninum* en perros aparentemente sanos que no mostraban signología, siendo estos de una zona urbana en su mayoría, sin embargo, la prevalencia fue relativamente baja (39). Por este motivo nuestro trabajo fue enfocado en los perros que conviven con ganado y no muestran ningún signo de enfermedad, los resultados de casos positivos obtenidos con los ensayos de PCR y LAMP son mínimos, representan el 4% del total de las muestras evaluadas.

El diagnóstico con PCR y LAMP en las muestras de sangre obtenidas de perros evaluados en nuestro estudio la identificación de material genético de *N. caninum* se observó en perros de 8.5 (\pm 3.5) años de edad, lo cual concuerda con el estudio de Recalde realizado en el año 2013, en el cual los resultados mostraron que los animales seropositivos correspondían en su mayoría a animales gerontes, siendo estos animales los más susceptibles a padecer enfermedades porque su inmunidad comúnmente baja por el proceso natural de senescencia (39).

En la presente investigación, al contrastar los resultados obtenidos con los ensayos de PCR y LAMP en la detección de material genético de *N. caninum* en sangre total,



estadísticamente no mostraron diferencias significativas, este resultado concuerda con el estudio de Mahittikorn *et. al.* (2017), en el cual encontraron 15 casos positivos de 396 muestras de sangre obtenidos de perro que conviven con ganado, no presentaron discrepancia entre estos dos ensayos ya que ambas identificaron la parasitosis en los mismos perros (26), al contrario con nuestros resultados positivos, en los cuales obtuvimos un caso en PCR y pero negativo para LAMP, dos casos positivos para LAMP y negativos para PCR y uno que fue común para PCR y LAMP. Plutzer en el año 2009 describe el porqué de estas variaciones, con nuestro primer caso cabe destacar una característica importante en LAMP, con el uso de 6 cebadores que reconocen 8 regiones distintas, solo el gen diana es estricta y específicamente amplificada teniendo la capacidad de discriminar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) que pudo estar presente en esta muestra positiva al PCR, pero negativa a LAMP. Adicionalmente, otra característica de LAMP es que tiene menores posibilidades de ser afectada por inhibidores lo cual explicaría el caso de los negativos a PCR y positivos a LAMP (40).

Por otro lado, se ha demostrado también que LAMP es entre 10 a 100 veces más sensible a nivel analítico que la PCR convencional y es una herramienta valiosa y beneficiosa en países en desarrollo debido a su desempeño sin la necesidad de contar con equipos avanzados o expertos para operarlo (6). Este ensayo se lo puede realizar mediante baño María a temperatura constante y no requiere de reactivos caros, por lo tanto es una herramienta recomendada a nivel de campo.

Finalmente, es importante señalar que en éste trabajo los procedimientos aplicados para la colecta, transporte, conservación, procesamiento y extracción de material genético de la sangre total de los perros fueron validados mediante la aplicación de un control de proceso, el cual debe realizarse antes o junto con los ensayos de PCR y LAMP. Es importante aplicar un control de proceso que nos indique que en el transcurso de la toma de muestras, almacenamiento y extracción de ADN no ha existido contaminación o degradación del material genético, garantizando resultados confiables de los ensayos aplicados para la identificación de un patógeno.



CAPITULO VI: CONCLUSIONES

Se concluye que los ensayos biomoleculares PCR y LAMP de manera similar son capaces de diagnosticar *N. caninum* a partir de una muestra de sangre periférica de perro.

Se obtuvo material genético de *N. caninum* en perros que conviven con ganado bovino en las zonas rurales de la ciudad de Cuenca.

Todos estos animales estaban en una edad promedio de 8.5 (± 3.5) años, por lo tanto se los considera animales gerontes.

CAPITULO VII: RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores se debe ampliar el número de muestras, incluir otro tipo de matrices como líquido cefalorraquídeo o heces de animales que muestren signología compatible con neosporosis.

Considerar la comparación de estos ensayos biomoleculares con otro tipo de pruebas como cultivos y serología.



CAPITULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carolina S, Aguirre S. Evaluación del efecto del uso de la vacuna (Bovilis®Neoguard) en la reducción de la tasa de abortos en cuatro Haciendas de la Sierra Ecuatoriana. [Tesis]. Universidad San Francisco Quito; 2008.
2. Nidia Puray, Amanda Chávez EC, Néstor Falcón GC. Prevalencia de *Neospora caninum* en bovinos de una empresa ganadera de la sierra central del perú. Rev Inv Vet Perú. 2006;17(2):189–194.
3. Escalona JJ, Corro AC, Suárez CE, Castillo TA, Pineda YA. Seropositividad a *Neospora caninum* en perros de áreas rurales y urbanas del estado Yaracuy, Venezuela. Rev la Fac Ciencias Vet. 2013; 54(1): 29–34.
4. Ravelo L. Estudio clínico, serológico y coprológico preliminar de *Neospora caninum* en caninos de la clínica veterinaria Dover Bogotá-Colombia. [Tesis]. Universidad de la Salle; 2009.
5. Schares G, Pantchev N, Barutzki D, Heydorn AO, Bauer C, Conraths FJ. Oocysts of *Neospora caninum*, *Hammondia heydorni*, *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi* in faeces collected from dogs in Germany. Int J Parasitol. 2005;35(14):1525–1537.
6. Wong Y-P, Othman S, Lau Y-L, Son R, Chee H-Y. Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Versatile Technique for Detection of Microorganisms. J Appl Microbiol. 2017; 124(3):626-643.
7. OIE. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. 2013.
8. del Campo JS, Chávez A V, Delgado AC, Falcón NP, Ornelas AA, Casas EA, et Marcela Estefanía Abril Vásquez
Nidia Mirella Siguenza Guaman



Universidad de Cuenca

- al. Frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del Valle de Lima. Rev Inv Vet Perú. 2003;14(2):145–149.
9. Cardona J, Martínez Y, Betancur C. Seroepidemiología de hembras bovinas naturalmente infectadas por *Neospora caninum* en Corboda, Colombia. Rev UDCA. 2015;18(2):401–408.
10. Matías Mainato Guamán. Neosporosis bovina. [Tesis]. Universidad de Cuenca; 2011.
11. García GÁ. Identificación y caracterización de antígenos de “*Neospora caninum*” con interés inmunodiagnóstico en bovinos. [Tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003.
12. Cordero Del Campillo M. Parasitología general / M. Cordero Del Campillo. In: Parasitología general. Madrid: McGraw Hill Interamericana; 2001. p. 330–332.
13. Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Šlapeta J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. Int J Parasitol Parasites Wildl. 2015;4(2):216–238.
14. Williams DJL, Hartley CS, Björkman C, Trees AJ. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* - How the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. Parasitology. 2009;136(14):1895–1900.
15. Morales E. Neosporosis Bovina [sede Web]. México D.F.: Albeitar; 2015. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3427/articulos-rumiantes-archivo/neosporosis-bovina:-una-actualizacion.html>
16. Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol. 2003;41(1):1–16.



17. Reichel MP, Ellis JT, Dubey JP. Neosporosis and hammondirosis in dogs. *J Small Anim Pract.* 2007;48(6):308–12.
18. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(2):323–367.
19. Barber JSTAJ. Clinical aspects of 27 cases of Neosporosis in Dogs. *Vet Rec.* 1996;139(June 1995):439–443.
20. Buxton D, McAllister MM, Dubey JP. The comparative pathogenesis of neosporosis. *Trends Parasitol.* 2002;18(12):546–552.
21. Reichel MP, McAllister MM, Pomroy WE, Campero C, Ortega-Mora LM, Ellis JT. Control options for *Neospora caninum*-Is there anything new or are we going backwards *Parasitology*. 2014;141(11):1455–1470.
22. Silva R, Machado G. Canine neosporosis: perspectives on pathogenesis and management. *Vet Med Res Reports.* 2016;7:59-70.
23. De Jesus EEV, Santos AB Dos, Ribeiro CSO, Pinheiro AM, Freire SM, El-Bachá RS, et al. Role of IFN- γ and LPS on neuron/glial co-cultures infected by *Neospora caninum*. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:1–9.
24. Elsheikha HM, McKinlay CL, Elsaied NA, Smith PA. Effects of *Neospora caninum* infection on brain microvascular endothelial cells bioenergetics. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):24. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-24>
25. Ramos AE, Muñoz M, Cortés-Vecino JA, Barato P, Patarroyo MA. A novel loop-mediated isothermal amplification-based test for detecting *Neospora caninum* DNA. *Parasites and Vectors.* 2017;10(1):1–9.



26. Mahittikorn A, Thammasonthijarern N, Roobthaisong A, Udonsom R, Popruk S, Siri S, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification technique and comparison with quantitative real-time PCR for the rapid visual detection of canine neosporosis. *Parasit Vectors.* 2017;10(1):394. DOI 10.1186/s13071-017-2330-2
27. Müller N, Zimmermann V, Hentrich B, Gottstein B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridization immunoassay. *J Clin Microbiol.* 1996;34(11):2850–2852.
28. Santana OI, Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Parra MR, Morales CC, Gallardo DQ. *Neospora caninum:* Detección de ADN en sangre durante la primera gestación de vaquillas infectadas naturalmente. *Vet Mex.* 2010;41(2):131–137.
29. Opini CDE. Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP . Ventajas en el Diagnóstico Sanitario. *2016;3:11–14.*
30. V GL, J BR, Restrepo M, C MAL, Murillo V, Chica A, et al. Estudio para evidenciar la presencia de *Neospora caninum* en bovinos de la hacienda San Pedro en el municipio de Fredonia. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 2007;2(1):7–19.
31. Vargas JJ, Cortés JA. *Neospora caninum*, ¿Una zoonosis potencial? *Rev Salud Pública.* 2001;3(1):89–93.
32. Rodríguez AM. Transmisión horizontal y vertical de *Neospora Caninum* en tres sistemas de cría bovina. [Tesis]. Universidad Nacional del Mar de Plata; 2015.
33. Robayo Sánchez LN, Gómez Marín JE, Cortés Vecino JA. *Neospora caninum:* Relación biológica con *Toxoplasma gondii* y su Potencial como zoonosis. *Rev MVZ Córdoba.* 2017;22(3):6355-6365.



Universidad de Cuenca

34. Benavides, Katia; Potosí, Grishel; Roque L. Risk factors to Neosporosis canine, at seropositive dairies to *Neospora caninum* in Pasto, Nariño, Colombia. Rev Investig Pecu. 2016;4:55–9.
35. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals-The last five years. Vet Parasitol. 2011;180(1-2):90–108.
36. Devens BA. Neosporose canina: biología, etiología, sinais clínicos, diagnóstico e controle. PUBVET. 2010;4.
37. Ghaheri M, Kahrizi D, Yari K, Babaie A, Suthar RS, Kazemi E. Cellular and Molecular Biology A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. Cell Mol Biol. 2016;62(3):119–23.
38. Yucaza Tipán MG. Determinación de *Neospora caninum* en el cantón Mejía: relación canino-bovino. [Tesis]. Universidad Central del Ecuador; 2015.
39. Recalde Salazar DC. Determinación serológica de *Neospora caninum* en pacientes caninos de dos clínicas veterinarias al Norte de Quito. Universidad de las Américas; 2013.
40. Plutzer J, Karanis P. Rapid identification of *Giardia duodenalis* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from faecal and environmental samples and comparative findings by PCR and real-time PCR methods. Parasitol Res. 2009;104(6):1527–33.



Universidad de Cuenca

CAPITULO IX: ANEXOS

Anexo 1. Registro de toma de muestras, coordenadas, edad, sexo y resultados del control de proceso, PCR y LAMP.

FECHA / LUGAR	COORDENADAS	CÓDIGO	EDAD (años)	SEXO	CONTROL DE PROCESO	PCR (0)/(1)	LAMP (0)/(1)
17/8/2018 BAÑOS	2°55'13"S 79°3'24"O	001 002 003 004 005 006 007 008 009 010	4 4 2 4 14 4 5 1 1 3	H M M H M M M H M M	+	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
SININCAY	2°52'5"S 79°0'15"O	011 012 013 014 015 016 017 018 019	1 2 3 4 3 3 3 1,6 7	H H H H M H M M	+	0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0
18/8/2018 SANTA ANA	2°56'24,63"S 78°55'12,1040"O	020 021 022 023 024	12	M H H H M	+	0 0 0 0 0	1 0 0 0 0
24/8/2018 QUINGEO	3°01'50"S 78°55'56"O	025 026 027 028 029 030	5 2 5 1,6 1 2	H M M H M H	+	0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0
25/8/2018 QUINGEO	3°01'50"S 78°55'56"O	031 032 033 034 035 036 037 038 039 040 041 042 043 044	2 3 8 1 0,6 1 1,6 4 2 3 5 3 1 7	H H H H M M M M M H M H M	+	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0



Universidad de Cuenca

		045	1	M	+	0	0
		046	5	M	+	0	0
		047	1,6	H	+	0	0
		048	5	M	+	0	0
		049	4	M	+	0	0
		050	5	M	+	0	0
26/8/2018	2°57'4"S 78°55'56"O	051	9	M	+	0	0
SANTA ANA		052	5	M	+	1	1
		053	0,9	M	+	0	0
		054	0,9	H	+	0	0
		055	1,6	H	+	0	0
		056	3,6	H	+	0	0
		057	7	H	+	0	1
28/8/2018	2°59'7,659"S 79°4'55,505"O	058	4	M	+	0	0
TARQUI		059	4	M	+	0	0
		060	1	M	+	0	0
		061	2	H	+	0	0
		062	7	M	+	0	0
		063	5	M	+	0	0
		064	5	M	+	0	0
	2°59'11,514"S 79°4'51,997"O	065	1,2	M	+	0	0
		066	10	M	+	0	0
		067	4	M	+	0	0
		068	12	M	+	0	0
VICTORIA DEL PORTETE	3°4'48,66"S 79°4'31,171"O	069	3	M	+	0	0
		070	5	M	+	0	0
	3°4'27,897"S 79°4'25,308"O	071	9	M	+	0	0
29/8/2018	2°48'38"S 79°0'5"O	072	5	M	+	0	0
CHIQUINTAD		073	5	M	+	0	0
		074	0,8	M	+	0	0
		075	10	M	+	0	0
		076	10	M	+	0	0
		077	7	H	+	0	0
		078	0,5	M	+	0	0
30/8/2018	2°56'13"S 79°2'46"O	079	1,6	H	+	0	0
NARANCAY		080	2	H	+	0	0
		081	2	H	+	0	0
		082	4	H	+	0	0
30/8/2018	2°51'39"S 78°58'45"O	083	7	H	+	0	0
RICAURTE (CAMAL)	2°51'40"S 78°58'46"O	084	6,8	M	+	0	0
		085	1,8	M	+	0	0
		086	8	H	+	0	0
		087	12	M	+	0	0
		088	10	H	+	0	0
		089	3	M	+	0	0
		090	11	M	+	1	0
		091	7	M	+	0	0
		092	6	H	+	0	0

Marcela Estefanía Abril Vásquez

Nidia Mirella Siguenza Guaman



Universidad de Cuenca

31/8/2018	2°56'54"S 79°2'9"O	093	6	M	+	0	0
TURI		094	0,11	M	+	0	0
		095	4	M	+	0	0
		096	1	H	+	0	0
		097	6	M	+	0	0
		098	6	M	+	0	0
		099	5	H	+	0	0
		100	10	H	+	0	0

*0 =muestras negativas a *N. caninum*

*1 =muestras positivas a *N. caninum*

*+ =Positivo a Control de Proceso

*- =Negativo a Control de Proceso

*H =Hembra

*M =Macho