

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria Zootecnia

Evaluación de una ADN polimerasa *Bst_LF* de producción local en ensayos LAMP para la detección de *Neospora caninum* en muestras de bovinos (*Bos taurus*)


Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médica Veterinaria Zootecnista

Autora:

Estefanía Tatiana Sigüenza Jiménez

Director:

Antonio Javier Vallecillo Maza

ORCID:  0000-0001-9141-0176

Cuenca, Ecuador

2023-08-02

Resumen

Neospora caninum es un parasito intracelular de gran importancia ganadera por las grandes pérdidas económicas tanto productivas como reproductivas. En nuestro país, las técnicas moleculares aplicables al diagnóstico no están al alcance de la mayoría de ganaderos debido a los costos y el tiempo para obtener los resultados, lo que impide realizar un diagnóstico preciso de la enfermedad. El objetivo de este estudio es evaluar el uso de una enzima ADN polimerasa *Bst_LF* producida en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca en un ensayo LAMP, para la detección de material genético de *N. caninum* en muestras biológicas de bovinos (*Bos taurus*), teniendo como referencia una enzima comercial. Se empleó 50 muestras de tejido de encéfalo de fetos y 50 muestras de leche. Los resultados obtenidos en las muestras de leche con las dos enzimas fueron 100 % negativos, por lo tanto no se pudo detectar ADN del patógeno. En las muestras de encéfalo con la enzima comercial se identificó un 40% de muestras positivas y con la enzima local un 26% de muestras positivas existiendo diferencia numérica pero no estimándose diferencias significativas con el análisis de McNemar. Con la prueba estadística de McNemar no hubo diferencias significativas entre ambas enzimas ($p = 0.0654$), por lo tanto la enzima local *Bst_LF* muestra la misma capacidad para la detección de material genético de *N. caninum* en el tejido de encéfalo de fetos bovinos en comparación a la de la enzima comercial *Bsm*.

Palabras clave: neospora caninum, diagnóstico de laboratorio, adn polimerasa, ganado bovino



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

Neospora caninum is an intracellular parasite of great importance in cattle breeding due to the great economic losses, both productive and reproductive. In our country, molecular techniques applicable to diagnosis are not available to most farmers due to the costs and time required to obtain the results, which prevents an accurate diagnosis of the disease. The objective of this study is to evaluate the use of a DNA polymerase *Bst_LF* enzyme produced in the Molecular Biology Laboratory of the Faculty of Agropecuary Sciences of the University of Cuenca in a LAMP assay, for the detection of *N. caninum* genetic material in biological samples of bovine (*Bos taurus*), using a commercial enzyme as a reference. We used 50 fetal brain tissue samples and 50 milk samples. The results obtained in the milk samples with the two enzymes were 100 % negative, therefore it was not possible to detect DNA of the pathogen. In the brain samples, 40% of positive samples were identified with the commercial enzyme and 26% of positive samples with the local enzyme, there being a numerical difference but no significant differences with McNemar's analysis. With McNemar's statistical test there were no significant differences between both enzymes ($p = 0.0654$), therefore the local enzyme *Bst_LF* shows the same capacity for the detection of *N. caninum* genetic material in bovine fetal brain tissue compared to that of the commercial enzyme Bsm.

Keywords: neospora caninum, laboratory diagnosis, dna polymerase, cattle



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Capítulo 1: Introducción	12
1.1. Objetivos	14
1.1.1. Objetivo general	14
1.1.2. Objetivos específicos.....	14
1.2 Pregunta de investigación	14
Capítulo 2: Revisión de literatura	15
2.1 Generalidades	15
2.2. Agente etiológico	15
2.3. Ciclo biológico	16
2.4. Patogénesis.....	17
2.5. Transmisión.....	18
2.5.1. Transmisión vía transplacentaria o vertical	18
2.5.2. Transmisión horizontal.....	18
2.6. Signos clínicos en el ganado bovino.....	18
2.6.1. Lesiones	19
2.7. Diagnóstico.....	19
2.7.1. Técnicas directas.....	19
A. Aislamiento del parásito	19
B. Histopatología	20
C. Inmunohistoquímica (IHQ)	20
D. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	21
2.7.2. Técnicas indirectas.....	21
A. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	21
B. Ensayo de inmunoabsorción acoplado a enzimas indirecto (ELISA indirecto).....	22
C. Aglutinación directa (DAT)	22
2.7.3. Técnica LAMP	22
2.8. Control y prevención.....	24
2.9. Factores de riesgo.....	25
2.10. Salud publica.....	26
Capítulo 3: Materiales y métodos.....	29

3.1. Actividad 1. Ensayo LAMP para la detección del ADN de N. caninum con el uso de la ADN polimerasa Bst_LF	29
3.2. Actividad 2. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio.	31
3.3. Actividad 3. Ensayo LAMP para la detección del ADN de N. caninum con el uso de la ADN polimerasa Bsm comercial.	33
3.4. Actividad 4. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP (uso de enzima comercial) mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio.	33
3.5. Actividad 5. Análisis estadístico	33
3.6. Área de estudio	33
Capítulo 4: Resultados	34
4.1. Muestras seleccionadas de material genético de las muestras de leche y tejido de sistema nervioso central de fetos bovinos previamente validadas (Control de proceso) ..	34
4.2. Ensayo LAMP control con la enzima (ADN polimerasa Bst_LF) producida en el laboratorio	35
4.3. Ensayo LAMP para la detección de material genético de N. caninum en las muestras de leche con la enzima comercial Bsm.....	35
4.4. Ensayo LAMP para la detección de material genético de N. caninum en las muestras de leche con la enzima local Bst_LF	36
4.5. Ensayo LAMP para la detección de material genético de N. caninum en las muestras de tejido de sistema nervioso central de fetos bovinos con la enzima comercial Bsm.	37
4.6. Ensayo LAMP para la detección de material genético de N. caninum en las muestras de tejido de sistema nervioso central de fetos bovinos con la enzima local Bst_LF	37
4.7. Comparación de los ensayos LAMP con la enzima producida localmente Bst_LF y la comercial Bsm aplicado a las muestras de leche y tejido, mediante la prueba de McNemar	38
Capítulo 5: Discusión	40
Conclusiones	42
Recomendaciones	42
Referencias.....	43
Anexos.....	49

Índice de figuras

Figura 1. Sección transversal de 4 taquizoitos intracelulares (flecha). Fuente: (Pèrez <i>et al.</i> , 2019).	16
Figura 2. Ciclo de vida de <i>N. caninum</i> . Fuente: (Pèrez <i>et al.</i> , 2019).....	17
Figura 3. Quistes tisulares con bradizoitos de <i>N. caninum</i> en corte histopatológico de cerebro de feto de bovino. Fuente: (Sánchez & Rodríguez, 2018).....	20
Figura 4. Representación esquemática de los cebadores usados en LAMP, FLP y BLP son usados en LAMP en tiempo real. Fuente: (Sánchez <i>et al.</i> , 2014).....	24
Figura 5. Detección de LAMP por turbidez. Los productos de la PCR solo se detectan mediante electroforesis. Fuente: (Sánchez <i>et al.</i> , 2014).....	24
Figura 6. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de bovino (<i>Bos taurus</i>) con la enzima comercial <i>Bsm</i> , ensayos correspondientes al control de proceso de las muestras de leche. Carriles 1-15, Reacciones LAMP y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kbp DNA Ladder, No. cat.: SM1331).	34
Figura 7. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de bovino (<i>Bos taurus</i>) con la enzima comercial <i>Bsm</i> , ensayos correspondientes al control de proceso de las muestras de tejido. Carriles 1-15, Reacciones LAMP y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kbp DNA Ladder, No. cat.: SM1331).	34
Figura 8. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP control con la enzima ADN polimerasa <i>Bst_LF</i> de producción local. Carril 1, ADN polimerasa <i>Bsm</i> comercial; Carril 2, enzima ADN polimerasa <i>Bst_LF</i> ; Carril 3, reacción sin enzima y Carril MPM, Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, No cal.: 15628050).	35
Figura 9. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de <i>N. caninum</i> en las muestras de leche con la enzima comercial <i>Bsm</i> . Carriles 1-14, muestras negativas y Carril MPM, Marcador de peso molecular (100 bp Opti-DNA markers, No. cat.: G016).....	36
Figura 10. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de <i>N. caninum</i> en las muestras de leche con la enzima local <i>Bst_LF</i> . Carriles 1-10: muestras negativas y Carril MPM: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, No cal.: 15628050).	36

Figura 11. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de tejido con la enzima comercial *Bsm*. Carriles 26 y 27: muestras positivas, Carriles 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29 y 30: muestras negativas y Carril MPM: Marcador de peso molecular (100 bp Opti-DNA markers, No. cat.: G016). 37

Figura 12. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de tejido con la enzima de producción local *Bst_LF*. Carriles 22, 27 y 28: muestras positivas, Carriles 20, 21, 23, 24, 25, 26, 29 y 30: muestras negativas y Carril MPM: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, No cal.: 15628050). 38

Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de sistemas de amplificación y detección de ácidos nucleicos. Fuentes: (Lira <i>et al.</i> , 2018).....	23
Tabla 2. Medidas de control de la Neosporosis bovina. Fuente: (Morales, 2016).....	25
Tabla 3. Frecuencia de positividad a <i>N. caninum</i> en perros que viven en establos lecheros. Fuente: (Del Campo <i>et al.</i> , 2003).	26
Tabla 4. Presencia de <i>N. caninum</i> en el suero de pacientes positivos al virus de la inmunodeficiencia humana en Mato Grosso do Sul, Brasil. Fuente: (Oshiro <i>et al.</i> , 2015)....	28
Tabla 5. Distribución de los resultados obtenidos en los ensayos LAMP con el uso de la enzima <i>Bst_LF</i> local versus con la enzima comercial ADN polimerasa <i>Bsm</i> para la detección de material genético de <i>N. caninum</i> en 50 muestras de leche y 50 muestras de encéfalo de fetos bovinos.....	38

Agradecimientos

Agradezco a toda mi familia por su apoyo y palabras de aliento para lograr mis metas y a los docentes que me brindaron una mano amiga y supieron guiarme para finalmente ser una profesional.

Dedicatoria

Para mi mamá, gracias por todo el sacrificio, tiempo y paciencia que tuvo que invertir en mí para que llegue a culminar mis estudios, esta meta cumplida es suya.

Para José Pacheco que me impulso a seguir adelante y no rendirme hasta terminar la carrera, estuviste en los momentos más difíciles y por ti soy fuerte.

Y para mi director de tesis por su apoyo y las largas conversaciones que me inspiraron para seguir luchando en la vida, es un ejemplo a seguir, gracias por todo.

Acrónimos

Abreviatura:

OMS	Organización Mundial de la Salud.
LAMP	Loop-mediated isothermal AMPLification (Amplificación isotérmica mediada por bucle).
ADN	Àcido Desoxirribonucleico.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
Bst_LF	<i>Bacillus stearothermophilus</i> _Large Fragment.
Bsm	<i>Bacillus smithii</i> .
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta.
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test.
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzima).
IB	Immunoblotting (Inmunotransferencia).
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana.
MEM	Medio esencial mínimo.
RMPI	Roswell Park Memorial Institute, medio celular utilizado para cultivos celulares.
HE	Hematoxilina-Eosina
PBS	Solución de fosfato salino buferada o suero fisiológico.

Capítulo 1: Introducción

La Neosporosis de los bovinos es una enfermedad causada por *Neospora caninum* (*N. caninum*), un parásito intracelular obligado de distribución mundial que afecta a distintas especies de animales tanto domésticos como silvestres, entre ellos cabras, ovejas, caballos, vacas, perros (Huerta & Martínez, 2013), venados de cola blanca, camellos, búfalos de agua, primates, zorros, entre otras especies (Romero, 2006). Este parásito en el ganado puede afectar a cualquier tipo y a cualquier edad y su mayor impacto económico se encuentra en el ganado lechero, se caracteriza por provocar abortos, el nacimiento de becerros con signos clínicos nerviosos, débiles, con dificultad para caminar o el nacimiento de becerros sin signos clínicos pero portadores de infecciones congénitas que probablemente pueden persistir durante toda su vida, además puede disminuir la producción lechera afectando los ingresos del ganadero (Morales, 2016). En estudios realizados se han estimado pérdidas en la industria lechera que superan anualmente los 100 millones de dólares en Australia, en Argentina más de 50 millones al año, pero en estudios recientes se estima pérdidas de 800 millones. En el caso de los abortos causados por este parásito de reportes de varios países se estimaron pérdidas que van desde 1 billón hasta 2.4 billones de dólares anuales (Echaide, 2000).

La Neosporosis es una enfermedad que ha tenido relevancia en los propios perros pero más aún en los bovinos debido al impacto negativo que le causa a la economía del ganadero, pero son pocas las investigaciones realizadas en otras especies y principalmente en los humanos que podrían adquirir el parásito de la misma manera que sucede con las vacas. Por tal motivo es esencial contar con técnicas diagnósticas aplicables a muestras de bovinos y seleccionar la adecuada que pueda aportar al ganadero un rápido diagnóstico a un costo accesible, y de esta manera tomar las medidas necesarias para evitar la circulación de la enfermedad y la diseminación de la misma, ya que sin la correcta identificación del agente causal de la enfermedad, las medidas de control y prevención que se tomen pueden convertirse en una pérdida de tiempo y recursos económicos.

Para el adecuado manejo de una enfermedad infecciosa se requiere de un diagnóstico preciso en donde se identifique al agente causal, según la OMS un ensayo diagnóstico debe cumplir los siguientes criterios: especificidad, sensibilidad, rapidez, bajo costo, simplicidad, adaptabilidad a la temperatura y equipos de fácil disponibilidad (Garrido, 2016).

LAMP es una prueba diagnóstica que se destaca por ser eficaz y fácil de realizar, su nivel de sensibilidad y especificidad diagnóstica puede llegar a ser superior a la técnica de PCR; amplifica el ADN del patógeno al punto de permitir la visualización directa de la reacción, también puede ser cuantitativa, además llama la atención como un método de amplificación de ADN rentable, rápido y preciso para la detección de microorganismos, y es una técnica

que se puede aplicar para el diagnóstico clínico, de la mano con la vigilancia de las enfermedades infecciosas, una ventaja adicional de esta prueba es el no requerimiento de personal altamente especializado ni de equipos sofisticados y un tiempo de diagnóstico aproximado a un día, lo que permite una toma de acciones oportunas en menos tiempo (Garrido, 2016).

Por todo lo antes descrito y debido a la prevalencia de bovinos infectados con este protozoo, es indispensable un diagnóstico rápido, confiable, eficiente y eficaz que permita identificar bovinos seropositivos a *N. caninum*. Para lo cual, la presente investigación buscó evaluar un ensayo LAMP para identificar *N. caninum* en muestras de bovinos (tejidos de sistema nervioso central y leche) con el uso de una enzima ADN polimerasa producida localmente en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, lo cual permitirá ser una herramienta económica y accesible para el ganadero, frente a una enzima comercial, lo que acelerará y facilitará los estudios para evaluar el grado de exposición en los hatos ganaderos, disminuir las pérdidas económicas y generar más investigaciones sobre zoonosis a humanos a través del consumo de leche u otras vías de transmisión.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo general

Evaluar el uso de una enzima ADN polimerasa *Bst_LF* producida en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, en un ensayo LAMP para la detección de material genético de *Neospora caninum* en muestras biológicas de bovinos (*Bos taurus*).

1.1.2. Objetivos específicos

- Implementar un ensayo LAMP para la detección material genético de *Neospora caninum* en muestras biológicas de bovinos con el uso de la enzima ADN polimerasa *Bst_LF* producida en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

- Evaluar la capacidad de la enzima ADN polimerasa *Bst_LF* producida localmente, para la detección material genético de *Neospora caninum* en muestras biológicas de bovinos en contraste con el uso de una enzima comercial.

1.2 Pregunta de investigación

¿La enzima ADN polimerasa *Bst_LF* producida en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, muestra la misma capacidad para la detección de material genético de *Neospora caninum* en muestras biológicas de bovinos (*Bos taurus*) en comparación a la de una enzima comercial?

Capítulo 2: Revisión de literatura

2.1 Generalidades

La Neosporosis bovina es una enfermedad causada por el parásito *Neospora caninum* (*N. caninum*) que afecta a cualquier tipo de ganado y de cualquier edad, este parásito está estrechamente relacionado con *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) y su morfología tan similar hizo que inicialmente fuera identificado erróneamente (Innes *et al.*, 2000). Es un parásito intracelular obligado con una distribución mundial, fue descrito por primera vez en caninos como un síndrome neuromuscular causado por un protozoo intracelular denominado *N. caninum* (Moore *et al.*, 2005).

En 1989 fue reportado por primera vez en el ganado bovino, en los EEUU, determinándose así que el agente que previamente se había identificado en los perros era idéntico al que se encontró en muestras de ésta especie animal, sometidas a estudios de histopatología (Morales, 2016). Posteriormente se le asocio como causa de abortos en bovinos, problemas que pueden ser endémicos o epidémicos, alcanzando cifras mayores al 12,5 %, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas, así como con la disminución de la producción de carne y leche (Morales, 2016).

2.2. Agente etiológico

N. caninum es un protozoo perteneciente al phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina y a la familia Sarcocystidae, igual con los géneros Sarcocystis, Hammondia, Toxoplasma y Besnoitia. Los que pertenecen a la familia Sarcocystidae tienen una característica muy importante, que es tener un ciclo biológico heteroxeno y formar quistes en el hospedero intermediario, que en el caso de todos ellos sus hospedadores intermediarios son los herbívoros y los carnívoros los definitivos. A nivel biológico podemos encontrar diferencias muy notables con respecto al ciclo biológico, composición antigénica y manifestaciones clínicas de la infección. Por eso el uso de herramientas diagnósticas serológicas permiten diferenciar a *N. caninum* de las otras especies (Álvarez, 2003). Los estadios parasitarios reconocidos en su ciclo son: Taquizoíto, Bradizoíto y Esporozoíto. Los Taquizoítos y Bradizoítos se encuentran en los tejidos de hospedadores intermediarios, mientras que los Esporozoítos se eliminan en las heces del perro, animal que actúa tanto como hospedero definitivo e intermediario (**Figura 1**) (Donahoe *et al.*, 2015).

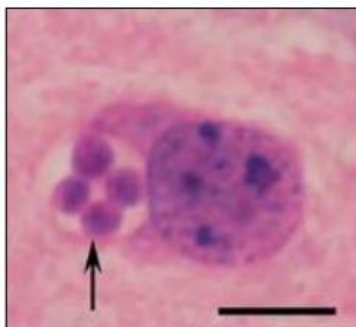


Figura 1. Sección transversal de 4 taquizoitos intracelulares (flecha). Fuente: (Pérez *et al.*, 2019).

2.3. Ciclo biológico

Los caninos (*Canis lupus familiaris*) son considerados el hospedero definitivo de *N. caninum*, esto se comprobó en 1998 mediante infección experimental y en 2001 mediante un reporte observándose la eliminación de ooquistes en perros infectados naturalmente (Innes *et al.*, 2000). El ciclo biológico transcurre en una fase sexual y asexual, en la cual el perro al consumir tejidos de animales infectados con *N. caninum*, a nivel intestinal se desarrolla la fase sexual del parásito, que se traduce en la eliminación de ooquistes al medio ambiente, mezclados con las excretas (Dubey, 2003). Los ooquistes esporulan en un periodo de uno a tres días y si son consumidos, mezclados con los alimentos y el agua de bebida por los hospederos intermediarios (bovinos, ovinos, caprinos y camélidos, entre otros), ya en el aparato gastrointestinal son capaces de alcanzar las vías sanguínea y linfática. A continuación, en la infección se desarrolla la fase asexual del parásito, con la liberación de Esporozoitos, que penetran en las células entéricas, transformándose en Taquizoítos (replicación rápida), que son diseminados a diversas células (células nerviosas, hepáticas, miocitos, fibroblastos, células epiteliales de los túbulos renales y de la placenta). Posterior a la diseminación de los Taquizoítos se sucede la formación de los Bradizoítos (replicación lenta) los cuales al enquistarse se transforman en los denominados “quistes tisulares” y cuya localización principal es el tejido nervioso (Rodríguez, 2009). La infección resultante por *N. caninum* es variable y depende del modo de infección, tipo de hospedador, factores fisiológicos (preñez, sexo, edad) y del parásito; incluso estos resultados variables se pueden observar en un mismo hospedero con estados fisiológicos similares, por lo tanto respalda el papel esencial del sistema inmune. Esta respuesta inmunitaria contra la infección inducida por *N. caninum* involucra la activación de células presentadoras de antígenos (principalmente macrófagos y células dendríticas) y la ayuda del Interferón-gamma que se conjuntan en la inducción de la producción de mediadores proinflamatorios (Fereig & Nishikawa, 2020).

El hospedador definitivo adquiere la infección al ingerir los tejidos de hospedadores intermediarios conteniendo quistes, dándose reinicio al ciclo. La pared del quiste tisular es degradada por los jugos gástricos liberándose las formas parasitarias que iniciarán los estados entero-epiteliales. Luego de transcurrida la fase de reproducción asexual y sexual en el intestino, los ooquistes son eliminados en las heces del hospedador definitivo. Es posible observar que los perros que consumen tejidos infectados pueden eliminar ooquistes, sin embargo mantienen su condición de seronegativos. Por otro lado, un canino que tiene el rol de hospedador intermedio puede ser seropositivo, transmitir la infección verticalmente a sus cachorros en el caso de hembras, y manifestar una signología clínica, caracterizada por el desarrollo de miositis, parálisis y dermatitis (**Figura 2**) (Moore *et al.*, 2005).

En el ganado bovino esta parasitosis es responsable de una patología que se caracteriza principalmente por provocar abortos, el nacimiento de terneros clínicamente sanos, pero persistentemente infectados, o el nacimiento de becerros débiles y con signos clínicos nerviosos (Yucaza, 2015).

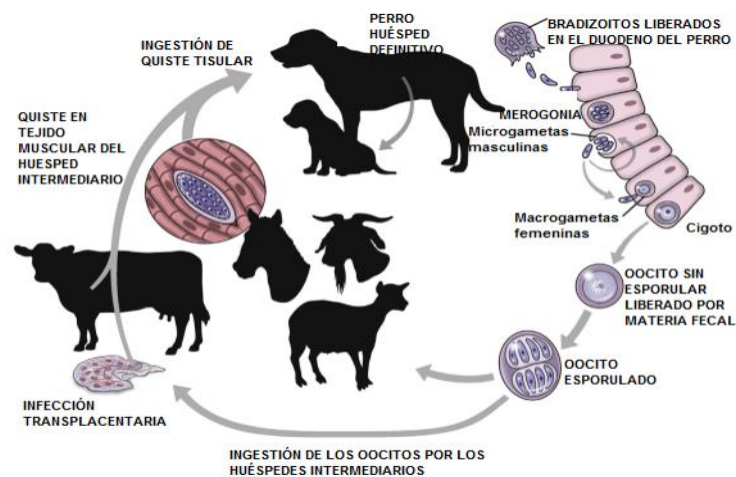


Figura 2. Ciclo de vida de *N. caninum*. Fuente: (Pèrez *et al.*, 2019).

2.4. Patogénesis

Los Bradizoítos alojados en los quistes tisulares del sistema nervioso central en una hembra bovina gestante pueden reactivarse bajo ciertas influencias hormonales e inmunológicas llevando al desarrollo de parasitemia. Al producirse parasitemia, ya sea por reactivación de quistes latentes o como resultado de una infección oral reciente, los Taquizoítos no sólo atraviesan la placenta induciendo necrosis e inflamación, sino que acceden a los tejidos fetales por vía hematogena. En las células infectadas del feto, se inician procesos de multiplicación mediante endodiogenia, ocasionando daño celular con necrosis e inflamación, o se forman quistes tisulares capaces de persistir durante toda la vida del animal. Mecanismos hormonales e inmunes maternos ocurridos durante la gestación, sumado al desarrollo del

sistema inmune fetal actuarían determinando si la infección desencadena la muerte del feto, el nacimiento de un ternero congénitamente infectado o el nacimiento de un ternero libre de infección (Rodríguez, 2009).

2.5. Transmisión

2.5.1. Transmisión vía transplacentaria o vertical

Es la principal vía de transmisión en los bovinos, se ha observado que más del 80 % de las vacas seropositivas transmiten el parásito a su descendencia, dando poca importancia a la infestación *post-natal*. Ésta transmisión que se da a lo largo de varias generaciones en el ganado parece ser la vía más importante por el cual el parásito es mantenido circulando en el hato bovino (Hernandez *et al.*, 2001).

2.5.2. Transmisión horizontal

La Neosporosis bovina también se puede adquirir por exposición *post-natal*, luego de la ingestión de alimentos contaminados con Taquizoitos con material de abortos, placentas infectadas u ooquistes presentes en las heces de los perros. Las diferentes prácticas de manejo que se realizan comúnmente en hatos ganaderos como la alimentación, sanidad, higiene durante el parto, manejo de animales, criterios de selección y reemplazo pueden influir en la presencia y nivel de afectación del hato por Neosporosis. En la actualidad, la presencia del parásito en perros y en bovinos es frecuente. Adicionalmente, anticuerpos en contra de *N. caninum* se han encontrado en animales silvestres, situación que sugiere un papel de los caninos salvajes en la circulación y transmisión de la enfermedad (Yucaza, 2015).

2.6. Signos clínicos en el ganado bovino

Los abortos son el principal signo clínico, usualmente sucede entre los 3 y 9 meses de la gestación, aunque con mayor frecuencia en el tercio medio. El feto muerto en el útero puede ser reabsorbido, momificado, o expulsado con avanzado grado de autólisis. Aunque no es patognomónico, la momificación es un hallazgo relativamente frecuente. Lo que ocurre con mayor frecuencia es el nacimiento de terneros clínicamente normales, pero crónicamente infectados. Los terneros infectados en el útero pueden tener signos neurológicos y bajo peso al nacimiento, el examen clínico puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar o falta de sensibilidad propioceptiva, eventualmente pueden presentarse anomalías congénitas como exoftalmia o asimetría ocular (Moore *et al.*, 2005).

2.6.1. Lesiones

Las principales lesiones son producto de la destrucción de células nerviosas, principalmente del sistema nervioso central, consecuencias de la multiplicación de los taquizoitos que producen inflamación no supurativa, necrosis y granulomas. En cambio un quiste con un bradizoito tisular por lo general no se rodea de inflamación. Adicionalmente se pueden observar focos de necrosis en el pericardio y el miocardio, área de infiltración mononuclear y de necrosis en el hígado y los pulmones, además de miositis del músculo esquelético; los órganos menos afectados son: glándulas adrenales, bazo, ojos, nódulos linfáticos y la piel (Morales & Trigo, 1996; Romero, 2006).

2.7. Diagnóstico.

Al comienzo, el diagnóstico se basaba en los signos clínicos, los hallazgos de necropsia y la histopatología de fetos abortados lo que condujo a la confusión con *T. gondii*. Actualmente, se basa en pruebas de laboratorio que garantizan un diagnóstico definitivo para animales sospechosos infectados con este parásito siendo el caso del ELISA, PCR y la Inmunofluorescencia, pero son de costo elevado (Romero, 2006).

2.7.1. Técnicas directas

A. Aislamiento del parásito

Es una técnica que se puede realizar *in vivo* o *in vitro*. En el caso de *in vivo* en experimentos realizados en 1998 se utilizaron ooquistes de las heces de perros y luego los inocularon en ratones lo que permitió definir al perro como el hospedador definitivo, en otros estudios *in vivo* con ratones se demostró la respuesta inmune y las lesiones de los diferentes estadios de este parásito (Rodríguez, 2009).

Usualmente el aislamiento de *N. caninum* *in vitro* se realiza a partir del tejido cerebral infectado de terneros nacidos vivos, fetos abortados o terneros sin signología infectados congénitamente. Los cultivos celulares que se infectan con este parásito son de las células cerebrales de bovinos, células endoteliales de la aorta pulmonar también de bovinos, de células del duodeno de caninos y las más utilizadas de las líneas de células Vero. Los medios de cultivo que se utilizan en estos estudios son MEM o RMPI, pero para prevenir contaminaciones secundarias bacterianas o fúngicas en los cultivos se añade Gentamicina, Penicilina o Anfotericina, también en lo que respecta a factores de crecimiento celular se suele utilizar suero fetal bovino o suero de equino adulto. El Óxido nítrico se puede utilizar

como factor de estrés para inducir a la fase de taquizoitos y obtener bradizoitos (Moreno, 2019).

B. Histopatología

Este estudio se realiza en placentas y fetos abortados, las muestras deben ser de más o menos 1 cm³ de grosor y colocarlos en frascos estériles de tapón rosca con 20 ml de una solución de Formol al 10 % por gramo de tejido, luego para la detección se utiliza la tinción Hematoxilina-Eosina; esta técnica permite demostrar la presencia de este parásito en estos tejidos al no existir lesiones macroscópicas patognomónicas, lo que se puede observar es: encefalitis focal (múltiples áreas de necrosis), infiltrado mononuclear, focos blanquecinos en miocardio y musculo esquelético, lesiones en sistema nervioso central (SNC) (sustancia gris y medula espinal), gliosis focal, miocarditis multifocal no supurativa y en los cortes histológicos quistes con numerosos bradizoitos o taquizoitos intracelulares, pero similares lesiones y estructuras se pueden encontrar en infecciones por *Sarcocystis sp*, *Toxoplasma gondii*, y *Hammondia hammondi*, así que la ayuda de pruebas como de inmunoperoxidasa pueden demostrar antígenos específicos de *N. caninum* (Sánchez & Rodríguez, 2018).

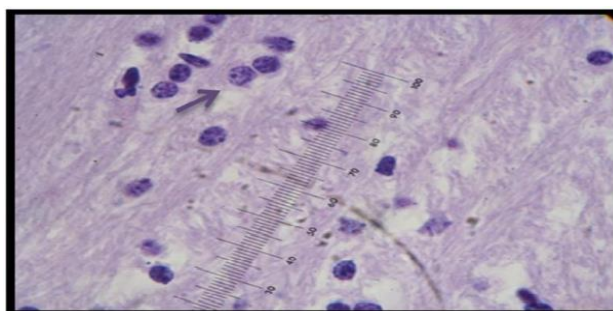


Figura 3. Quistes tisulares con bradizoitos de *N. caninum* en corte histopatológico de cerebro de feto de bovino. Fuente: (Sánchez & Rodríguez, 2018).

C. Inmunohistoquímica (IHQ)

Los abortos son principalmente diagnosticados por la detección de las lesiones en los tejidos y con la ayuda de pruebas como la inmunohistoquímica permite obtener un diagnóstico definitivo ya que detecta antígenos específicos de *Neospora* lo que facilita la diferenciación frente a otros protozoarios (Morales & Trigo, 1996). Para el desarrollo de esta técnica se puede utilizar anticuerpos específicos monoclonales o policlonales, secciones de cerebro fijados en láminas y muestras de placenta, pero hay autores que señalan que esta técnica es laboriosa y de baja sensibilidad debido a que son pocos los parásitos presentes en los tejidos (Rodríguez, 2009).

D. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica tiene una sensibilidad y especificidad diagnóstica elevada, y la capacidad de amplificar pequeñas cantidades de ADN de muchos tipos de tejidos por ejemplo de fetos abortados, animales adultos y de fluidos corporales como sangre, leche, semen, líquido cefalorraquídeo y líquido amniótico. Las dificultades que se presentan para el desarrollo de esta técnica es obtener tejidos *post-mortem* o fetos abortados en buen estado; las concentraciones bajas del parásito en tejidos, leche y semen, así que basado en esto, se ha demostrado que la mejor opción son las muestras sanguíneas *ante-mortem*. Los marcadores más utilizados son la secuencia repetitiva específico Nc-5 y el espaciador de transcripción interno (ITS1). La detección de ADN de *N. caninum* se ha reportado en la fracción de células blancas de la sangre de vacas seropositivas, y en el suero de animales tanto seropositivos como seronegativos, sin embargo, debido a sus costos elevados por los requerimientos de infraestructura, equipamiento y personal debidamente entrenado no es una técnica de rutina (Reyes *et al.*, 2017).

2.7.2. Técnicas indirectas

A. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Fue la primera técnica empleada para el diagnóstico serológico, actualmente se la considera como estándar de referencia en la comparación con otras técnicas diagnósticas que se van creando y su uso se aplica principalmente en estudios epidemiológicos que permite detectar anticuerpos anti-*N. caninum* en muchas especies animales, como: perros, bovinos, gatos, zorros, caprinos, ovinos, equinos, búfalos de agua, roedores y primates. Para llevar a cabo esta técnica se necesita de taquizoitos de *N. caninum* de origen canino o bovino y anticuerpos (conjugado anti-IgG de cada especie) marcados con Fluoresceína, ahora la dilución de las muestras de suero se realiza con solución salina buferada de fosfatos (PBS, por sus siglas en Inglés, Phosphate buffered saline) y el punto de corte para detectar la infección varía de acuerdo a la especie y hay casos que varían de acuerdo a la edad, los puntos de corte recomendados en IFI es 1:200 para ganado bovino adulto y 1:16–1:25 en fluidos de fetos. Se considera que un resultado es positivo cuando la fluorescencia se encuentra en toda la superficie del taquizoito y negativo cuando la fluorescencia se encuentra restringida a la parte apical del taquizoito, pero algo muy importante que se debe tener en cuenta son los falsos positivos al usar como medio de cultivo celular al suero fetal bovino que suele contener anticuerpos de *N. caninum*. El personal que ejecute esta técnica requiere de experiencia ya que los resultados dependen de la subjetividad del lector (Jara, 2009).

B. Ensayo de inmunoabsorción acoplado a enzimas indirecto (ELISA indirecto)

Esta técnica es muy utilizada en el diagnóstico serológico por su alta especificidad y sensibilidad diagnóstica y la facilidad en el procesamiento de una gran cantidad de muestras lo que permite que se aplique en hatos ganaderos con grandes cantidades de animales, al contrario en especies menores ya que los laboratorios reciben pocas muestras. El ensayo de ELISA indirecto ha tenido modificaciones utilizando diferentes tipos de antígenos como: taquizoitos fijados con Formalina, taquizoitos sonicados, antígenos incluidos en partículas iscom (Immune stimulating complexes) y antígenos recombinantes. Existen diferentes tipos de ELISA para el diagnóstico serológico, uno de los más utilizados es el ELISA indirecto con muestras de leche, suero y líquidos fetales para detectar anticuerpos, utiliza una mezcla de antígenos intracelulares, antígeno soluble de taquizoito y antígenos de membrana de aislados de *N. caninum*; el ELISA-sándwich para detectar anticuerpos de *N. caninum* en los bovinos, el ELISA soluble (ISCOM ELISA) que utiliza como antígeno un extracto de taquizoitos que se encuentra incorporado a un complejo inmunoestimulante, el ELISA múltiple para detectar anticuerpos de *N. caninum* en sueros ovinos, bovinos y caprinos, el ELISA de competición es una prueba indirecta que usa un anticuerpo monoclonal contra taquizoitos (Rodríguez, 2009).

C. Aglutinación directa (DAT)

Esta prueba serológica ha demostrado ser muy interesante, debido a que no requiere de anticuerpos secundarios específicos y se puede utilizar en un amplio intervalo de hospederos, es barata, tiene alta reproducibilidad entre operarios, es de fácil lectura, no necesita de muchos equipos y materiales, y ha mostrado una similar sensibilidad y especificidad diagnóstica a la técnica de IFI. El desarrollo de esta técnica es mediante el uso de taquizoitos (BPA-1 y Nc-1) fijados en Formalina que aglutinan ante la presencia de anticuerpos específicos en el suero diluido con PBS de pH 7.2; destruyendo las IgM por el tratamiento con β -Mercaptenol es posible detectar solo las IgG (Jara, 2009).

2.7.3. Técnica LAMP

Esta técnica fue desarrollada a principios de la década del 2000-2010, para convertirse en una alternativa a la técnica PCR que permite su uso fuera del laboratorio, es decir en lugares donde se requiere métodos de detección rápidos, sensibles y precisos para generar un diagnóstico inmediato (**Tabla 1**) (Lira *et al.*, 2018). LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) es un ensayo de biología molecular variante de la técnica de PCR, ya que amplifica fragmentos específicos de la cadena de ADN conocido como secuencia diana,

facilitando la detección de patógenos; y aunque tiene un complejo mecanismo de acción, se destaca por ser eficaz y fácil de realizar. Esta técnica en comparación con PCR utiliza condiciones isotérmicas (una sola temperatura a lo largo del ensayo), también una enzima polimerasa de ADN con actividad de desplazamiento de la cadena de ADN junto con la polimerización (Garrido, 2016). Utiliza de 4 hasta 6 cebadores, y estos son: 2 cebadores internos, 2 cebadores externos y los más interesantes son 2 cebadores bucle que se unen a sitios inaccesibles para los cebadores internos por lo tanto esto permite acelerar la reacción de amplificación. En total reconoce 8 secuencias diferentes del ADN blanco (**Figura 3**). Su nivel de sensibilidad y especificidad diagnóstica puede llegar a ser superior a la técnica de PCR, amplifica el ADN del patógeno al punto de permitir la visualización directa de la reacción por la turbidez que se genera cuando el resultado es positivo; esta turbidez es debido a que los pirofosfatos formados durante la amplificación reaccionaran con iones Magnesio (**Figura 4**) (Sánchez *et al.*, 2014). Su amplificación también puede ser cuantitativa, además llama la atención como un método de amplificación de ADN rentable, rápido y preciso para la detección de microorganismos, y es una técnica que se puede aplicar para el diagnóstico clínico, de la mano con la vigilancia de las enfermedades infecciosas, una ventaja adicional de esta prueba es el limitado requerimiento de personal altamente especializado, equipos sofisticados y el tiempo de diagnóstico aproximado a un día, lo que permite una toma de acciones oportunas en menos tiempo (Garrido, 2016).

Característica	PCR	LAMP
Molécula blanco	DNA/RNA	DNA/RNA
Ciclos de temperatura	sí, múltiples	no, isotérmica
Numero de <i>primers</i>	2	4-6
Diseño de <i>primers</i>	sencillo	complejo
Tiempo de realización	60 min	30-60 min
Cantidad de DNA amplificado	~ 0.2 µg	~10-20 µg
Detección visual	no	si
Sensibilidad a inhibidores	si	no
Termoestabilidad	hasta 90°C	≤70°C

Tabla 1. Comparación de sistemas de amplificación y detección de ácidos nucleicos. Fuentes: (Lira *et al.*, 2018).

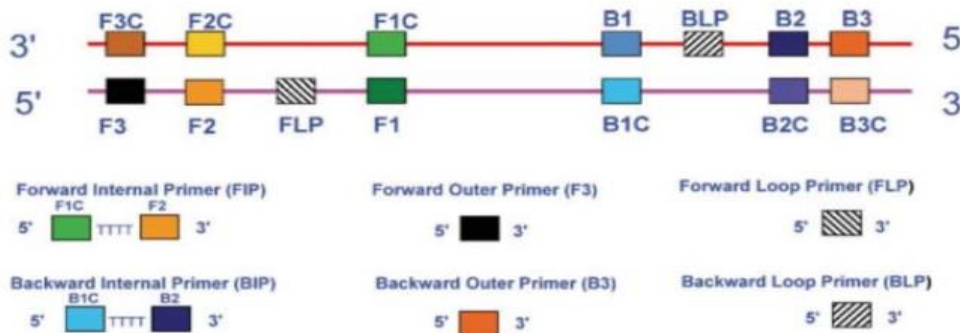


Figura 4. Representación esquemática de los cebadores usados en LAMP, FLP y BLP son usados en LAMP en tiempo real. Fuente: (Sánchez *et al.*, 2014).

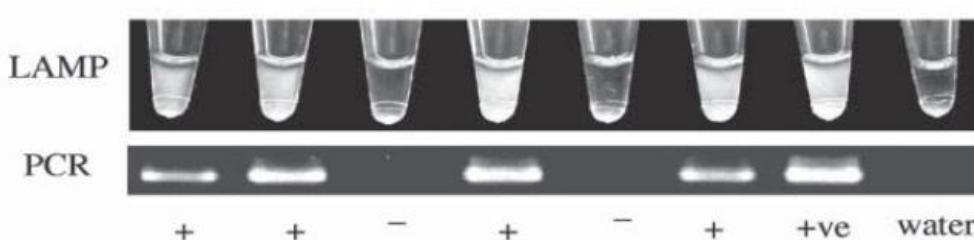


Figura 5. Detección de LAMP por turbidez. Los productos de la PCR solo se detectan mediante electroforesis. Fuente: (Sánchez *et al.*, 2014).

2.8. Control y prevención

Para tomar las adecuadas medidas de control y prevención es necesario conocer el reservorio exacto del parásito, caso contrario no sería posible; pero por el momento se están evaluando algunas vacunas y fármacos para su posible tratamiento, se han realizado estudios *in vitro* de *N. caninum* para al menos 43 antimicrobianos y solo 17 mostraron una eliminación total del número de taquizoitos cultivados *in vitro*, las sustancias más efectivas fueron Clindamicina, Diclazuril, Robenidina y Pyrimethamina pero su eficacia aún no ha sido estudiada *in vivo* en los bovinos, en cambio en otro estudio probaron el Toltrazuril y Ponazuril en terneros inoculados experimentalmente y lograron reducir las lesiones cerebrales. Actualmente no existe un tratamiento eficaz en los bovinos (Moore *et al.*, 2005). Es por eso la importancia de las medidas de control y prevención; se sospecha que los ooquistes eliminados en las heces del hospedador definitivo sean la fuente de infección para los bovinos, por lo tanto el agua y los alimentos deben protegerse y almacenarse para evitar su contaminación (Vargas & Cortés, 2001).

En el caso de los perros no se entiende completamente como se infectan en la naturaleza, pero se considera que se transmite de la madre a sus hijos en la etapa terminal de su gestación o a través de la leche en la etapa *post*-natal. En un estudio alimentaron a 4 perros con ooquistes de *N. caninum*; no se hallaron ooquistes en sus heces, 2 fueron seropositivos,

pero una vez sacrificados, en los tejidos de ninguno se encontró el parásito, ni las etapas del parásito ni el ADN, resultados que sugieren que la transmisión fecal podría no ser importante en la transmisión del parásito para el hospedador definitivo. Teóricamente la ingestión de tejidos de cualquier animal infectado o que contenga quistes tisulares es la fuente más probable de infección para los carnívoros. Por lo tanto las medidas de control que se deben tomar en el caso de fetos abortados de bovinos o presas capturadas, es realizar su correcta eliminación, enterrar o incinerar, pero que no queden al alcance de animales domésticos y/o salvajes y tener un calendario de desparasitación (**Tabla 2**) (Dubey & Schares, 2011).

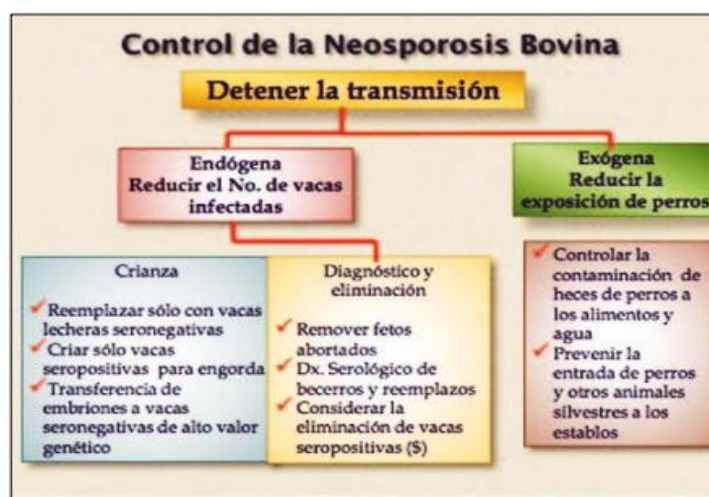


Tabla 2. Medidas de control de la Neosporosis bovina. Fuente: (Morales, 2016).

2.9. Factores de riesgo

En algunos estudios epidemiológicos se ha encontrado una relación entre la presencia de perros o el número de perros en los establos lecheros y la cantidad de vacas que resultan positivas a la infección por métodos de diagnóstico serológicos. En Colombia en el 2016 Benavides *et al.*, evaluaron los factores de riesgo de *N. caninum* en perros de 10 hatos lecheros positivos para este parásito, se realizaron encuestas y los resultados arrojaron que las variables de riesgo de consumo de placenta y desparasitaciones (casi nulas) fueron estadísticamente significativas, concluyendo que el inadecuado manejo de los perros dentro de estos sistemas de producción lechera, aumenta el riesgo de posibles infecciones de *N. caninum* (Benavides *et al.*, 2016). En Perú en el 2003 Del Campo *et al.*, realizó un estudio para determinar la frecuencia de *N. caninum* en perros de 23 hatos lecheros, analizando 104 muestras de suero, para detectar anticuerpos contra *N. caninum* con la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), encontrando que del total de muestras el $32.7 \pm 9.0\%$ (34/104) fueron positivas y solo en dos provincias tuvieron los niveles de seropositividad más altos (**Tabla 3**) (Del Campo *et al.*, 2003).

Con respecto al ganado productor de carne y de doble propósito, todavía no hay evidencia de que la presencia de perros propios o ajenos que se introducen a la unidad de producción, representen un verdadero factor de riesgo, posiblemente debido a que estos bovinos consumen mayor cantidad de forraje verde y menor cantidad de alimento almacenado, disminuyendo la probabilidad del consumo de alimentos contaminados con excretas de perros o cánidos silvestres. Por otro lado, debe tomarse en cuenta que se ha identificado la presencia de *N. caninum* en aves silvestres y de corral, éstas se han relacionado con vacas seropositivas y abortos. En roedores silvestres también se ha identificado este parásito, sin embargo, el significado biológico preciso de la presencia del parásito en estas especies y el papel que pudieran desempeñar en la transmisión del agente a los bovinos no se ha establecido. Otros factores de riesgo que se han relacionado con la seropositividad en vacas, son el agua de estanques para consumo de los bovinos, y la presencia de otros animales como patos y conejos (Morales, 2016).

Lugar	Animales (n)		Frecuencia %
	Muestreados	Positivos	
Zona			
Huaura - Huaral	17	10	58.8
Lima Norte	32	8	25.0
Lima Sur	33	9	27.3
Cañete	22	7	31.8
Edad			
<1 año	16	4	25.0
1-7 años	78	25	32.1
>7años	10	5	50.0
Sexo			
Macho	58	21	36.2
Hembra	46	13	28.3
Total:	104	34	32.7 ± 9.0

Tabla 3. Frecuencia de positividad a *N. caninum* en perros que viven en establos lecheros. Fuente: (Del Campo *et al.*, 2003).

2.10. Salud pública

Como ya se mencionó anteriormente la Neosporosis es una enfermedad que genera un gran impacto económico en los ganaderos y está asociado a la presencia de los perros. Son pocos los estudios realizados en humanos por lo que se desconoce su potencial zoonótico y lo que se sabe es que *N. caninum* está estrechamente relacionado con *T. gondii* por su semejanza clínica y patológica, es por ello que antes de ser descrita los animales afectados por Neospora eran erróneamente diagnosticados con *T. gondii*.

En 1999 Tranas *et al.*, en Nueva York examinaron 1.029 muestras sanguíneas de donantes, de estas solo el 6,7 % presentaban títulos de 1:100 en las pruebas IFA, también se confirmó la especificidad de los sueros positivos para los antígenos de *N. caninum*, demostrando de

esta manera pruebas de la exposición humana a *N. caninum* aunque los títulos de anticuerpos en donantes sanos eran bajos (Tranas *et al.*, 1999).

En el 2005 en Brasil en una investigación realizado por Lobato *et al.*, evaluaron la presencia de anticuerpos específicos para *N. caninum* en poblaciones humanas seropositivos y seronegativos para *T. gondii*, analizando 256 muestras de suero, divididas en 4 grupos, y mediante pruebas de ELISA indirecto, IFAT (Indirect fluorescent-antibody test) e IB (Immunoblotting), encontrando los siguientes resultados, se detectó un 38 % de seropositivos a *N. caninum* en pacientes con VIH, 18 % en pacientes con trastornos neurológicos, 5 % en recién nacidos y 6 % en personas sanas, indicando con estos resultados la presencia o exposición de *N. caninum* en los humanos, pero principalmente en pacientes con VIH y trastornos neurológicos que pueden tener infecciones oportunistas debido a su sistema inmunocomprometido (Lobato *et al.*, 2006).

En Brasil en el 2015 Oshiro *et al.*, investigaron la presencia de anticuerpos para *N. caninum* y *T. gondii* en 310 personas con VIH de Mato Grosso do Sul y de 32 personas con VIH de Paraná, mediante la prueba IFAT, sus resultados fueron los siguientes: para *N. caninum* una seropositividad del 26,1 % (81/310) en Mato Grosso do Sul y 31,2 % (10/32) en Paraná y para *T. gondii* una seropositividad del 76,8 % (238/310) en Mato Grosso do Sul y 68,7 % (22/32) en Paraná (**Tabla 4**) (Oshiro *et al.*, 2015).

En otro estudio realizado también en Brasil en el 2017 por Duarte, en el que se recogieron 201 muestras de sangre de cordón umbilical y tejido placentario de mujeres en la sala de parto para indagar la presencia de *N. caninum* y *T. gondii*, por un lado encontraron tasas de seropositividad del 24,3 % (49 muestras) y del 26,8 % (54 muestras), respectivamente para cada parásito, y en el 8,4 % de las muestras se encontró seropositividad para ambos parásitos; adicionalmente, mediante ensayos de PCR en muestras de sangre del cordón umbilical se detectó *N. caninum* en el 1 % (n = 2) de las muestras, y en el 8 % de ellas se identificó *T. gondii* (16 muestras). Basados en estos resultados los autores concluyen que la seroprevalencia en humanos a *N. caninum* probablemente sea una indicador de la frecuencia de la exposición al parásito, y podría estar asociada a la presencia de perros, pero se necesita más estudios que ayuden a determinar la importancia y el alcance de la exposición de los humanos, ya que hasta el momento no ha sido aislado *N. caninum* en tejidos humanos (Duarte *et al.*, 2020).

<i>Neospora canino</i>					
	Número de IFAT (1:50) +/- muestras	%	IFAT (1:100) +/%	IFAT (1:200) +/%	ESTOY GORDO (1:400) +/%
VIH	310	81/26.1	6/1.9	2/0.6	1/0.3

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; IFAT: ensayo de inmunofluorescencia; +: muestra positiva; %: porcentaje de muestra positiva.

Tabla 4. Presencia de *N. caninum* en el suero de pacientes positivos al virus de la inmunodeficiencia humana en Mato Grosso do Sul, Brasil. Fuente: (Oshiro *et al.*, 2015).

Capítulo 3: Materiales y métodos

Para evaluar la funcionalidad de la enzima ADN polimerasa *Bst_LF* producida en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, se seleccionaron 50 muestras de ADN total extraído de tejido de sistema nervioso central de fetos bovinos y 50 muestras de ADN total extraído de muestras de leche bovina; todas las muestras formaban parte del banco de material genético y las cuales previamente habían sido validadas.

3.1. Actividad 1. Ensayo LAMP para la detección del ADN de *N. caninum* con el uso de la ADN polimerasa *Bst_LF*

3.1.1. Materiales biológicos

- Muestras de ADN total extraído de las muestras de tejido de sistema nervioso central de fetos bovinos.
- Muestras de ADN total extraído de las muestras de leche bovina.

3.1.2. Materiales químicos o reactivos

- Agua grado biología molecular (Sigma, No. cat.: W4502).
- Solución de oligonucleótidos (Macrogen, Seoul, Republic of Korea)
- Soluciones de oligonucleótidos:
 - Ncan-FIP a 100 μ M (ACAGCCAAACACAACCCGACTCCATGAGGCCGGAGAATGAGA)
 - Ncan-BIP a 100 μ M (AAGGACAGGGTTGGGTATCGCGATGCCGCTCCTGAAGTC)
 - Ncan-F3 a 25 μ M (GGCTTCATGCGAGGTCTC)
 - Ncan-B3 a 25 μ M (TCAGTGAGCGATGTCCTCC)
 - Ncan-LF a 100 μ M (GAAGGAAGACACCTGGAAATCG)
 - Ncan-LB a 100 μ M (GGAGCTGGGTTGCTGTGCTC)
- Solución buffer de reacción 10X [200 mM de Tris-HCl (Sigma, No. cat.: T4661, Fisher chemical, No. cat.: A38C-212); 100 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fischer BioReagents, No. cat.: BP212R-1); 100 mM de KCl (Sigma, No. cat.: 746436) 20 mM MgSO_4 (Spectrum chemical MFG Corp, No. cat.: 230391) y 1 %Triton X-100 (Acros organics, No. cat.: 2156-8-2500), pH 8.8 a 25°C]
- Solución a 10 mM de cada uno de los dNTP's (Thermo scientific, No. cat.: R0181)
- ADN polimerasa *Bst_LF* (Producción local)
- Solución a 4 M de Betaina (Sigma, No. cat.: 61962)

3.1.3. Materiales de laboratorio y equipos

- Baño María/Termociclador
- Tubos de PCR (200 µl)
- Set de micropipetas de diferentes de volúmenes (1ml, 200 ul y 20 ul con puntas estériles)

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

Paso 1. Para la realización de los ensayos LAMP para detección de ADN de *N. caninum* en las muestras bovinas, con el uso de la enzima ADN polimerasa *Bst*_LF se inició con la preparación de una premezcla de los reactivos antes descritos (**Sección 3.1.1.** y **3.1.2.**) con el volumen requerido para el número de muestras analizadas (25 µl de volumen final por reacción) colocando en el siguiente orden los reactivos exceptuando las muestras de ADN total y la enzima:

Reactivo:	Concentración		Volumen
	inicial:	final:	por reacción*:
Agua grado biología molecular	No aplica	No aplica	12.2µl x n
Solución buffer de reacción	10X	1X	2.5 µl x n
Solución de Betaina	4 M	800 mM	5 µl x n
Solución de dNTP`s	10 mM	1.4 mM	0.7 µl x n
Oligonucleótido Ncan-FIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido Ncan-BIP	100 µM	1.6 µM	0.4 µl x n
Oligonucleótido Ncan-F3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido Ncan-B3	25 µM	0.2 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido Ncan-LF	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Oligonucleótido Ncan-LB	100 µM	0.8 µM	0.2 µl x n
Volumen final	-----	-----	22 µl x n

*n = número de muestras.

Paso 2. La premezcla preparada se llevó al vortex por 4 a 6 s, y se colectó por centrifugación a máxima velocidad durante 15 a 20 s.

Paso 3. Se marcaron los tubos de PCR (200 µl) y se les colocó 22 µl de la premezcla y se les adicionó 2 µl de la muestra de ADN total correspondiente.

Paso 4. Los tubos con las reacciones de amplificación (24 µl) se colocaron en el baño María o el termociclador para la incubación de esta premezcla con el fin de que suceda la desnaturalización del ADN y el alineamiento de los oligonucleótidos:

Paso:	Desnaturalización:	Alineamiento:
Tiempo (min´, s´´):	5´	5´
Temperatura (°C):	94 °C	4 °C

Paso 5. Culminado el tiempo de incubación, los tubos de PCR (200 µl) fueron retirados del baño María o del termociclador y se les añadió la enzima ADN polimerasa *Bst*_LF.

Reactivo:	Concentración		Volumen
	inicial:	final:	por reacción:
Enzima ADN polimerasa <i>Bst</i> _LF	----	----	1 µl
Volumen final:	----	----	25 µl

Paso 6. Posteriormente se sometió esta mezcla al proceso de extensión e inactivación en el baño María o el termociclador.

Paso:	Extensión:	Inactivación:
Tiempo (min', s'):	60'	10'
Temperatura (°C):	65 °C	80 °C

Paso 7. Una vez concluida la inactivación de las reacciones de amplificación, los tubos con las reacciones fueron almacenados a -20 °C hasta su empleo en la electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio para visualizar la presencia de los productos de amplificación.

3.2. Actividad 2. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio.

3.2.1. Materiales biológicos

- Reacciones del ensayo de LAMP

3.2.2. Materiales químicos y reactivos

- Agarosa (Invitrogen, No. cat.: 16500-100)
- Solución buffer TAE 1X [Solución de 40 mM Tris-acetato (Sigma, No. cat.: T4661, Fisher chemical, No. cat.: A38C-212), pH ≈ 8.0 y 1 mM EDTA (EDS)]
- Bromuro de Etidio [Solución a 10 mg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma, No. cat.: E7637)]
- Buffer de carga para ADN 6X [Solución a 10 mM de Tris-HCl (Sigma, No. cat.: T4661, Fisher scientific, A14C-212), pH 8.0; 60 mM de EDTA (EDS), 0.03 % de Azul de Bromofenol (Sigma, No. cat.: B8026); 0.03 % de Xilencianol (Sigma, No. cat.: X4126) y 60 % de Glicerol (Sigma, No. cat.: G5516)]
- Marcador de peso molecular 100 bp o 1 kbp (GeneRuler 100 bp o GeneRuler 1 kbp Plus DNA ladder, Thermo Scientific No. cat.: SM0241 o SM1331)

3.2.3. Materiales de laboratorio y equipos

- Set de micropipetas de diferentes volúmenes (1 ml, 200 µl, 50 µl y 20 µl con puntas estériles)
- Probeta de 100 ml
- Matraz de Erlenmeyer
- Balanza analítica (Mantener calibrada)
- Horno de microondas
- Bandeja para formación del gel de agarosa
- Peinillas para formar pocillos en el gel de agarosa
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fuente de poder
- Vortex
- Nanocentrífuga

3.2.4. Procedimiento de la detección de los productos amplificados del ensayo LAMP mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio

Paso 1. Se preparó la Solución buffer TAE 1X.

Paso 2. Se preparó el gel agarosa al 1.5 % en Solución buffer TAE 1X. Antes de que se gelifique se adicionó 1 µl de la Solución de Bromuro de Etidio por cada 10 ml del gel, y se vertió la agarosa en la bandeja para la formación del gel para continuar con la colocación de la peinilla para la formación de los pozos. Se dejó gelificar aproximadamente por 15 a 20 min.

Paso 3. A los tubos de las reacciones del ensayo LAMP sometidas al proceso de amplificación se les adicionó 5 µl de la Solución buffer de carga para ADN 6X. Se mezcló ambas soluciones con ayuda del vortex (3 a 5 s) y se concentró el volumen total de la mezcla con ayuda de la Nanocentrífuga (5 a 10 s).

Paso 4. De la mezcla de cada una de las reacciones del ensayo LAMP con la Solución buffer de carga para ADN 6X se tomó 10 µl y se inoculó en el pocillo correspondiente. En uno de los pozos se colocó 450 ng del marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp o GeneRuler 1 kbp Plus DNA ladder).

Paso 5. Los fragmentos se resolvieron en el gel de agarosa, sometiendo al mismo a 100 Voltios por el tiempo necesario de acuerdo a la longitud del gel (60 a 80 min).

Paso 6. Una vez resueltas las reacciones del ensayo LAMP, se fotodocumentaron para su análisis.

En el caso del ensayo LAMP se consideró como positivas a la presencia de ADN de *N. caninum* en aquellas reacciones en las que se observó una serie de fragmentos de ADN similar al patrón visualizado para el caso del marcador de peso molecular para ADN.

3.3. Actividad 3. Ensayo LAMP para la detección del ADN de *N. caninum* con el uso de la ADN polimerasa *Bsm* comercial.

Para esta actividad se emplearon los mismos materiales biológicos, químicos, reactivos, de laboratorio y equipos descritos en las secciones **3.1.1.**, **3.1.2.** y **3.1.3.**, exceptuando la enzima y su Solución buffer de reacción, que en este caso se usó la enzima comercial *Bsm* (Thermo scientific, No. cat.: EP0691) y como Solución buffer de reacción 1X [20 mM de Tris-HCl; 10 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 10 mM de KCl; 2 mM MgSO_4 y 0.1 %Triton X-100, pH 8.8 a 25°C].

De manera similar el procedimiento a seguir fue el mismo descrito en la sesión **3.1.4.**, con la excepción de la temperatura de amplificación, la cual fue de 60 °C, dado que esta enzima es termosensible y usualmente no muestra actividad a una temperatura de 65 °C.

3.4. Actividad 4. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP (uso de enzima comercial) mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio.

Para la visualización de las reacciones de amplificación de los ensayos LAMP con el uso de la enzima comercial ADN polimerasa *Bsm* se procedió a realizar lo descrito en la sección **3.2.**, y de manera similar se procedió a la interpretación de los resultados.

3.5. Actividad 5. Análisis estadístico

Para mostrar los resultados obtenidos en los ensayos LAMP para identificar el material genético de *N. caninum* se realizó una estadística descriptiva; mientras que para comparar los resultados obtenidos con los ensayos LAMP con el uso de la enzima *Bst*_LF de producción local *versus* los obtenidos con la enzima comercial ADN polimerasa *Bsm*, al tratarse de ensayos que se realizaron en las mismas muestras de ambos tipos (material genético de sistema nervioso central y leche bovina) se usó la prueba de McNemar.

3.6. Área de estudio

Las muestras que se incluyeron en esta investigación se seleccionaron del banco de material genético del Laboratorio de Biología Molecular, las muestras de leche fueron recolectadas en las zonas ganaderas aledañas a la ciudad de Cuenca y las muestras de encéfalo de feto en el camal municipal de Cuenca-Azuay.

Capítulo 4: Resultados

4.1. Muestras seleccionadas de material genético de las muestras de leche y tejido de sistema nervioso central de fetos bovinos previamente validadas (Control de proceso)

De la base de datos digitales se seleccionaron muestras viables de material genético del biobanco, previamente evaluadas mediante un control de proceso para la detección de material genético de bovino y se procedió con la investigación. A continuación se observa en las **Figuras 6 y 7** imágenes de electroforesis en gel de agarosa de las muestras de leche y tejido nervioso central incluidas en el presente estudio.

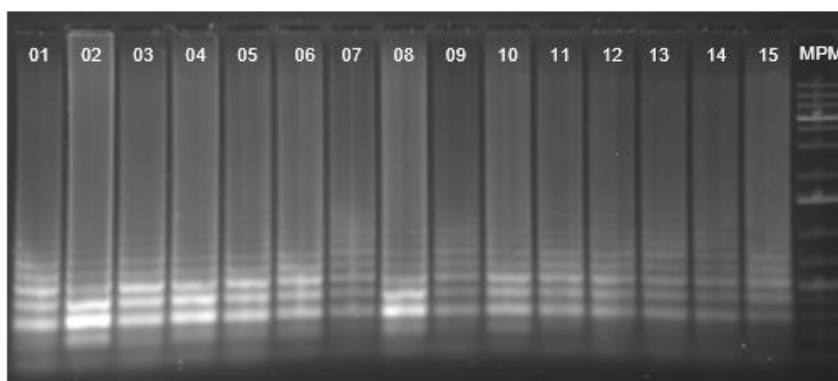


Figura 6. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de bovino (*Bos taurus*) con la enzima comercial *Bsm*, ensayos correspondientes al control de proceso de las muestras de leche. Carriles 1-15, Reacciones LAMP y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kbp DNA Ladder, No. cat.: SM1331).

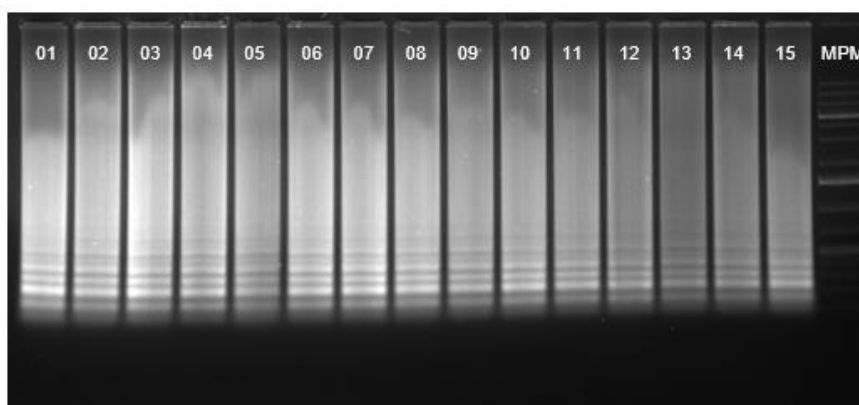


Figura 7. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de bovino (*Bos taurus*) con la enzima comercial *Bsm*, ensayos correspondientes al control de proceso de las muestras de tejido. Carriles 1-15, Reacciones LAMP y Carril MPM: Marcador de peso molecular (GeneRuler 1 kbp DNA Ladder, No. cat.: SM1331).

4.2. Ensayo LAMP control con la enzima (ADN polimerasa *Bst_LF*) producida en el laboratorio

Para evidenciar la actividad de la enzima producida en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca se realizó un ensayo control, con el uso de oligonucleotidos para la detección de ADN bovino (Zhang *et al.*, 2009). Como se puede observar en la **Figura 8**, la ADN polimerasa *Bst_LF* de producción local es activa a 65 °C, a diferencia de la ADN polimerasa *Bsm* comercial, la cual no es funcional a esa temperatura.

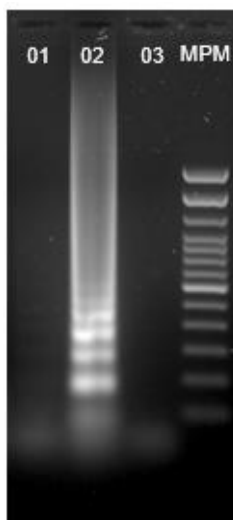


Figura 8. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP control con la enzima ADN polimerasa *Bst_LF* de producción local. Carril 1, ADN polimerasa *Bsm* comercial; Carril 2, enzima ADN polimerasa *Bst_LF*; Carril 3, reacción sin enzima y Carril MPM, Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, No cal.: 15628050).

4.3. Ensayo LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de leche con la enzima comercial *Bsm*.

De las 50 muestras de leche de ADN total del banco de material genético del laboratorio, se realizó el ensayo LAMP con la enzima comercial *Bsm* para la detección de ADN de *N. caninum*, siguiendo el procedimiento antes descrito, y evaluando la generación del patrón característico de amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio. Como se observa en la **Figura 9**, en ninguna de las muestras se evidenció amplificación, lo cual mostró un 100 % de muestras negativas, es decir que no fue posible detectar material genético de *N. caninum* en este ensayo aplicado a las muestra de leche.

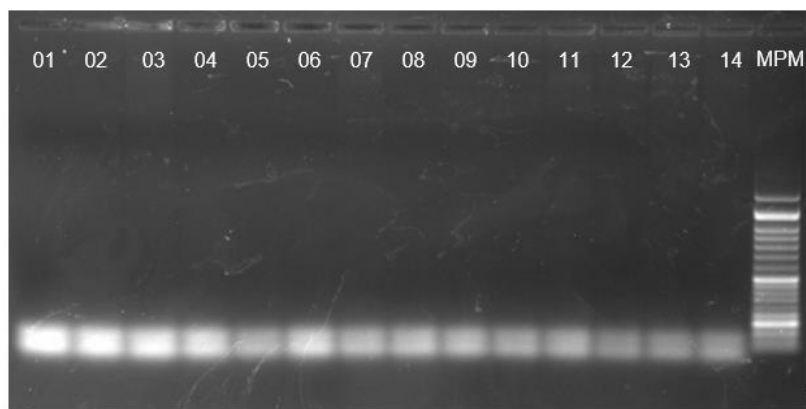


Figura 9. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de leche con la enzima comercial *Bsm*. Carriles 1-14, muestras negativas y Carril MPM, Marcador de peso molecular (100 bp Opti-DNA markers, No. cat.: G016).

4.4. Ensayo LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de leche con la enzima local *Bst_LF*

Para este ensayo se procedió con las 50 muestras de ADN de leche empleadas en el ensayo con la enzima *Bsm* comercial, ahora con la utilización de la enzima local *Bst_LF* para la detección de ADN de *N. caninum*, y mediante electroforesis en gel de agarosa TAE teñido con Bromuro de Etidio se pudo observar el mismo resultado cuando se empleó la enzima comercial, un total de 100 % de muestras negativas, no se logró detectar material genético para *N. caninum* en las muestras de leche con ambas enzimas.

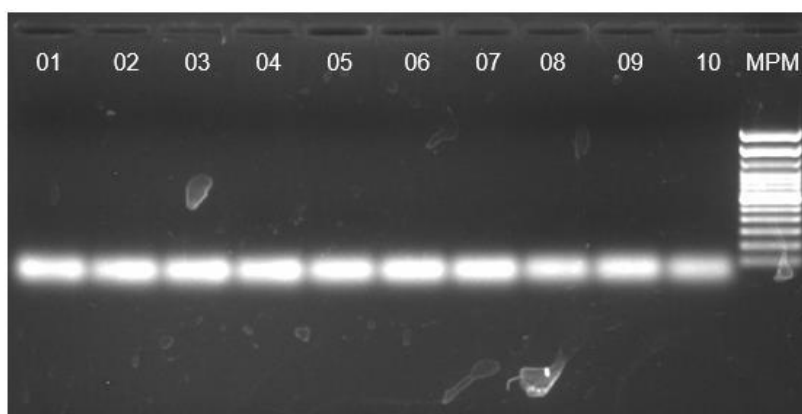


Figura 10. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de leche con la enzima local *Bst_LF*. Carriles 1-10: muestras negativas y Carril MPM: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, No cal.: 15628050).

4.5. Ensayo LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de tejido de sistema nervioso central de fetos bovinos con la enzima comercial *Bsm*.

A las 50 muestras seleccionadas del biobanco de ADN total obtenido de tejido de sistema nervioso central de fetos bovinos se realizó un ensayo LAMP con la enzima comercial *Bsm* para la detección de ADN de *N. caninum*. En la **Figura 11** es posible observar los carriles 26 y 27 reacciones positivas, carriles 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29 y 30 reacciones negativas con el uso de la enzima comercial y en la **Tabla 5** se muestra que un 40 % de las muestras analizadas tienen como resultado un patrón electroforético compatible a un resultado positivo a la presencia de material genético de *N. caninum*.

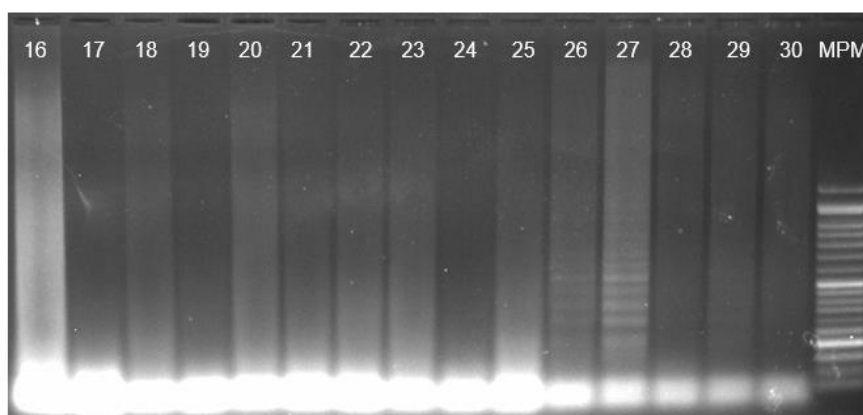


Figura 11. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de tejido con la enzima comercial *Bsm*. Carriles 26 y 27: muestras positivas, Carriles 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29 y 30: muestras negativas y Carril MPM: Marcador de peso molecular (100 bp Opti-DNA markers, No. cat.: G016).

4.6. Ensayo LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de tejido de sistema nervioso central de fetos bovinos con la enzima local *Bst_LF*

Para este ensayo con la enzima local *Bst_LF* se emplearon las mismas 50 muestras de ADN total obtenido de tejido de sistema nervioso central. En las 50 reacciones LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* con la enzima de producción local, resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa-TAE teñidos con Bromuro de Etidio (Ver **Figura 12**) se observó un 26 % de muestras positivas (**Tabla 5**) del total de las muestras.

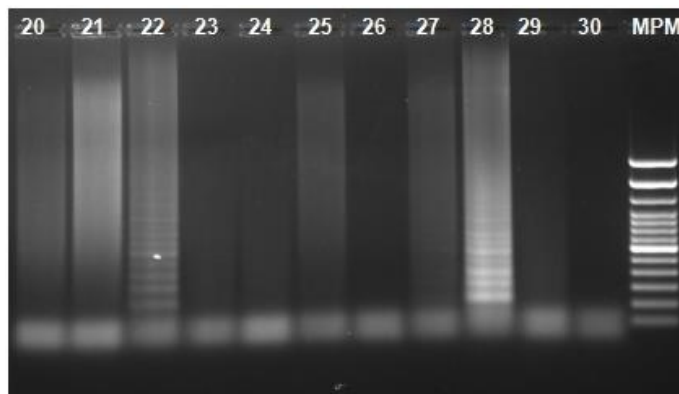


Figura 12. Electroforesis (gel de agarosa al 1.5 % teñido con Bromuro de Etidio) de reacciones LAMP para la detección de material genético de *N. caninum* en las muestras de tejido con la enzima de producción local *Bst*_LF. Carriles 22, 27 y 28: muestras positivas, Carriles 20, 21, 23, 24, 25, 26, 29 y 30: muestras negativas y Carril MPM: Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder, No cal.: 15628050).

4.7. Comparación de los ensayos LAMP con la enzima producida localmente *Bst*_LF y la comercial *Bsm* aplicado a las muestras de leche y tejido, mediante la prueba de McNemar

Para el análisis estadístico de los resultados de las reacciones LAMP se clasificó como muestra positiva a la presencia de material genético de *N. caninum* aquella en la que se identificó visualmente el patrón de bandas esperado en la imagen de la electroforesis en gel agarosa-TAE teñido con Bromuro de Etidio, capturadas con el fotodocumentador Gel Doc XR+ System (BioRad).

Tabla 5. Distribución de los resultados obtenidos en los ensayos LAMP con el uso de la enzima *Bst*_LF local versus con la enzima comercial ADN polimerasa *Bsm* para la detección de material genético de *N. caninum* en 50 muestras de leche y 50 muestras de encéfalo de fetos bovinos.

Validación	Muestras / Enzimas				McNemar valor <i>p</i> (0.05)
	Encéfalo		Leche		
	<i>Bsm</i> (comercial) N:50 (%)	<i>Bst</i> (local) N:50 (%)	<i>Bsm</i> (comercial) N:50 (%)	<i>Bst</i> (local) N:50 (%)	
(+)	20 (40)	13 (26)	0 (0)	0 (0)	0.0654
(-)	30 (60)	37 (74)	50 (100)	50 (100)	

Los resultados obtenidos en las 50 muestras de leche para detectar material genético de *N. caninum* tanto con la enzima local *Bst*_LF como con la enzima comercial *Bsm* fueron negativos. En cambio los resultados obtenidos en las 50 muestras de tejido sometidas a la detección de material genético de *N. caninum* con la enzima comercial *Bsm* y la enzima local

Bst_LF (**Tabla 5**), el análisis estadístico con la prueba McNemar muestra que no hay diferencias significativas al usar ambas enzimas ($p = 0.0654$), por lo tanto el lote de la enzima local *Bst_LF* muestra la misma capacidad para la detección de material genético de *N. caninum* en muestras de tejido de encéfalo de fetos bovinos en comparación a la de la enzima comercial *Bsm*.

Capítulo 5: Discusión

En la presente investigación se implementó un ensayo LAMP para detectar el material genético de *N. caninum* en muestras biológicas de bovinos con el uso de la enzima producida en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (ADN polimerasa *Bst_LF*), y contrastar los resultados obtenidos con ensayos realizados con la enzima comercial *Bsm*. Los resultados del ensayo LAMP implementado con la enzima local y la enzima comercial en las muestras de leche fueron negativos, probablemente porque los bovinos no portaban *N. caninum* al momento de la toma de muestras o la cantidad de ADN de este patógeno se encontraban bajo el porcentaje requerido para en este ensayo a ser detectados.

Por otro lado, para las 50 muestras de encéfalo de fetos bovinos se obtuvo un 26 % de positivas con la enzima *Bst_LF* de producción local, en contraste con un 40 % de positivas con la enzima comercial. La técnica LAMP ha mostrado adecuados resultados en Ecuador frente a la técnica molecular de PCR aplicable al diagnóstico y estudio de algunas enfermedades y tipos de muestras en diferentes especies de animales (Chuva, 2017; Alvarado, 2021; Carpio & Coello, 2021; Larriva & Picón, 2021); y algo muy importante resaltar, es una técnica muy factible con respecto a costos debido a que es más económica porque no requiere de equipos costosos (Abril & Sigüenza, 2019).

Como ya se indicó, en los ensayos LAMP para detectar *N. caninum* en las muestras de leche se obtuvo tanto con la enzima comercial (ADN polimerasa *Bsm*) como con la enzima de producción local resultados 100 % negativos, resultados que contrastan a los encontrados en 149 granjas lecheras de Irán donde se analizaron muestras de leche al granel mediante ELISA indirecto y PCR para detectar *Brucella spp*, *N. caninum*, *T. gondii* y mixta (*N. caninum* y *T. gondii*) en donde encontraron con ELISA indirecto: *Brucela* negativo, y positivos un 55% para *N. caninum*, 10.7% *T. gondii* y 2.7% mixta y con PCR: *Brucela* negativo; positivos un 55% para *N. caninum*, 5,4% *T. gondii* y 2.7% mixta, encontrando en Neospora el porcentaje más alto en comparación con las otras enfermedades, detectando la mayor infección en explotaciones con antecedentes de aborto, lo cual asociaron a factores como la presencia de perros y roedores, la edad de los animales y el tamaño del rebaño (Gharekhani *et al.*, 2021). De igual manera en España se realizaron un análisis de leche pero mediante la detección de anticuerpos con una prueba ELISA indirecto comercial, evaluando a 1.134 vacas de 38 granjas, dando como resultados la detección de la exposición a Neospora en el 94,7 % de los rebaños (Gonzàles *et al.*, 2011). Todos los investigadores que obtuvieron resultados positivos a este patógeno realizaron la toma de muestras en granjas con antecedentes de abortos.

En el caso del estudio realizado con muestras de encéfalo de fetos bovinos con el ensayo LAMP empleando la enzima comercial se obtuvo un 40 % de muestras positivas a la presencia de material genético de *N. caninum*, en contraste al emplearse la enzima local se obtuvo un 26 % de muestras positivas. Existiendo diferencia numérica pero no estimándose diferencias significativas con el análisis de McNemar. Estos resultados superan los valores positivos encontrados en investigaciones como la realizada en Venezuela en donde se analizaron mediante PCR 4 fetos bovinos recolectados durante 1 año en granjas con positividad del 28.1 % a anticuerpos anti-*N. caninum*, de los cuales fueron todos negativos para la presencia de ADN de *N. caninum* en tejido nervioso central, pero 2 muestras de tejido cardíaco fueron positivos (Linares *et al.*, 2017). En 2 establos de Lima, Perú se recolectaron 40 fetos abortados y mediante PCR se encontró un 37.5 % (15/40) de positivos de muestras de varios órganos, sin embargo el cerebro fue el órgano principal con un 100 % de positividad a la presencia de material genético de *N. caninum* (Matienzo, 2019). Por otro lado, en un estudio realizado en Colombia, en donde estudiaron 3 fincas con antecedentes de abortos y la presencia de animales (2 terneros y 1 vaca adulta) con signología nerviosa; procedentes de estos sitios se analizaron 6 fetos abortados de 2 a 7 meses, dos terneros fallecidos pocos días después del nacimiento y una vaca adulta, con la técnica PCR convencional en cultivos de células Vero inoculadas con muestras de varias porciones de los cerebros, encontrándose un 100 % de muestras positivas (Moreno, 2019).

Finalmente, en el presente estudio al compararse el uso de 2 enzimas en el ensayo LAMP material genético de 2 tipos de muestras biológicas diferentes (leche y encéfalo), evidenciándose una mayor utilidad para detección de ADN de *N. caninum* el empleo de muestras de tejido nervioso independientemente del tipo de enzima que se use.

Conclusiones

En los resultados obtenidos en las muestras de tejido nervioso se pudo detectar el ADN de *N. caninum* tanto con la enzima comercial y la enzima local, por lo que se puede considerar como una muestra biológica útil para evidenciar a *N. caninum* como causa de un posible aborto.

Por otro lado, no se encontró diferencias significativas en los resultados de los ensayos LAMP con ambas enzimas, evidenciándose la funcionalidad de la enzima *Bst_LF* de producción local para detectar el material genético de *N. caninum* en muestras de tejido de encéfalo de fetos bovinos.

Recomendaciones

Para que la enzima producida en el laboratorio Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca sea confiable para el diagnóstico de enfermedades, debe pasar por una serie de criterios de validación entre ellos: optimización del proceso de producción, estimar los rendimientos volumétricos, validación de los ensayos analíticos (LAMP), estimación de sensibilidad y especificidad, tanto analítica como diagnóstica, valores predictivos positivos y negativos, determinación del umbral diagnóstico y probar con otros ensayos y tipos de muestras. Una vez cumplido los criterios de validación se puede continuar con estudios de costos y establecer si generan precios más accesibles en comparación con enzimas comerciales.

Para investigaciones que se requiera el diagnóstico de *N. caninum* en bovinos con el ensayo LAMP, se recomienda realizarlo en hatos que presenten antecedentes de abortos, problemas nerviosos, presencia de portadores (perros, ratones. etc) y realizar tomas de muestras seriadas para obtener resultados en los diferentes ciclos de este protozoario.

Continuar realizando investigaciones con *N. caninum* en bovinos utilizando muestras de animales positivos con otras técnicas diagnósticas que demuestren la eficacia de estas técnicas para detectar el ADN de este parásito.

Referencias

- Abril, M. E., & Sigüenza, N. M. (2019). 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 de Grado, Universidad de Cuenca, 1–55. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/31739>
- Alvarado, P. G. (2021). Evaluación de la aplicación de un ensayo LAMP para el diagnóstico de Parvovirus canino tipo 2 (CPV-2) en heces. Tesis de Maestría, Universidad de Cuenca, 1–73. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/36849>
- Álvarez, G. (2003). Identificación y caracterización de antígenos de "*Neospora caninum*" con interés inmunodiagnóstico en bovinos. Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, 1–302. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/4780/>
- Benavides, K., Potosì, G., & Roque, L. (2016). Factores de riesgos a neosporosis canina en lecherías seropositivas a *Neospora caninum* en Pasto, Nariño, Colombia. RIVEP, 4(1), 55–59. <https://revistas.udenar.edu.co/index.php/revip/article/view/2418>
- Carpio, J. X., & Coello, D. J. (2021). Identificación de estadios larvarios de *Taenia solium* y *T. asiatica* en muestras de tejidos de cerdos (*Sus scrofa ssp domestica*) mediante LAMP. Tesis de Grado, Universidad de Cuenca, 1–73. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/37302>
- Chuva, D. A. (2017). Implementación y evaluación del ensayo amplificación isotérmica mediada por un lazo (LAMP) para detección de *Brucella abortus* en muestras biológicas de bovinos. Tesis de Grado, Universidad de Cuenca, 1–63. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28477>
- Del Campo, J., Chávez V, A., Delgado C, A., Falcón P, N., Ornelas A, Â., Casas A., E., & Serrano M, E. (2003). Frecuencia de *Neospora caninum* en perros de establos lecheros del valle de Lima. RIVEP, 14(2), 145–149. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1609-91172003000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Donahoe, S. L., Lindsay, S. A., Krockenberger, M., Phalen, D., & Šlapeta, J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl*, 4(2), 216–238. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002>
- Duarte, P. O., Oshiro, L. M., Zimmermann, N. P., Csordas, B. G., Dourado, D. M., Barros, J. C., & Andreotti, R. (2020). Serological and molecular detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in human umbilical cord blood and placental tissue samples. *Sci. Rep.*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65991-1>
- Dubey, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 41(1), 1–16. <https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1>
- Dubey, J. P., & Schares, G. (2011). Neosporosis in animals—The last five years. *Vet. Parasitol.*, 180(1), 90–108. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031>
- Echaide, I. (2000). La Neosporosis bovina. *Producción animal*, 1–6. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/14-la_neosporosis_bovina.pdf
- Fereig, R., & Nishikawa, Y. (2020). From signaling pathways to distinct immune responses: key factors for establishing or combating *Neospora caninum* infection in different susceptible hosts. *Pathogens* 2020, 9(5), 384; <https://doi.org/10.3390/pathogens9050384>
- Garrido, P. (2016). Técnica de amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP. *ECUADOR ES CALIDAD-Revista Científica Ecuatoriana*, 3(1), 4. <https://revistaecuadorestabilidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorestabilidad/index.php/revista/article/view/50>
- Gharekhani, J., Yakhchali, M., Afshari, A., & Adabi, M. (2021). Herd-level contamination of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Brucella* in milk of Iranian dairy farms. *Food Microbiol.*, 100, 103873. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103873>
- González, M., Castro, J. A., Carro, C., & Mezo, M. (2011). Anti-*Neospora caninum* antibodies in milk in relation to production losses in dairy cattle. *Prev. Vet. Med.*, 101(1), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.019>

- Hernandez, J., Risco, C., & Donovan, A. (2001). Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 219(5), 632–635. <https://doi.org/10.2460/javma.2001.219.632>
- Innes, E. A., Buxton, D., Maley, S., Wright, S., Marks, J., Esteban, I., Rae, A., Schock, A., & Wastling, J. (2000). Neosporosis: Aspects of epidemiology and host immune response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 916(1), 93–101. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05278.x>
- Jara, J. (2009). Determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en el distrito de Jenaro Herrera, Loreto. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1–68. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/714>
- Larriva, D. S., & Picón, M. A. (2021). Evaluación de la frecuencia del gen mecA de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA) en muestras de hisopado cutáneo y nasal de equinos de la provincia del Azuay mediante la técnica de LAMP. Tesis de Grado, Universidad de Cuenca, 1–79. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/36744>
- Linares, N., Mata, E., & Almeria, S. (2017). Abortion by *Neospora caninum* in bovine herds of CARORA breed in Venezuela. *Ágora De Heterodoxias*, 3(2), 112-127. <https://revistas.uclave.org/index.php/agora/article/view/165>
- Lira, R., De la Cruz, J., Maldonado, A., & Rojas, O. (2018). Sistemas de amplificación isotérmica para la detección molecular de los virus zika, dengue y chikungunya. Facultad de medicina UNAM, 42, 92-102. <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2020/02/9-Lira-Carmona.pdf>
- Lobato, J., Mineo, T. W. P., Amaral, J. D. H. F., Segundo, G. R. S., Costa-Cruz, J. M., Ferreira, M. S., Borges, A. S., & Mineo, J. R. (2006). Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: High seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clin. Vaccine Immunol.*, 13(1), 84–89. <https://doi.org/10.1128/CVI.13.1.84-89.2006>

- Matienzo, A. (2019). Detección de *Neospora caninum* en fetos abortados en bovinos lecheros de Huacho y Cañete. Universidad Peruana Cayetano Heredia, 1-61
<https://hdl.handle.net/20.500.12866/7233>
- Moore, D. P., Odeón, A. C., Venturini, M. C., & Campero, C. M. (2005). Neosporosis bovina: conceptos generales, inmunidad y perspectivas para la vacunación. *Rev. Argent. Microbiol.*, 37(4), 217–228.
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412005000400011
- Morales, E. (2016). Neosporosis bovina: Control y prevención. Sitio Argentino de Producción Animal, 1-5. https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/enfermedades_reproduccion/191-Neosporosis_bovina.pdf
- Morales, E., & Trigo, F. (1996). Neosporosis como causa de aborto en el ganado bovino. Universidad Nacional Autónoma de México, 1-19.
<https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol7/CVv7c1.pdf>
- Moreno, S. (2019). Aislamiento, caracterización morfológica y molecular preliminar de *Neospora caninum* de fetos de bovinos abortados de Cundinamarca y Cesar. Universidad Nacional de Colombia, 1-87.
<https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/76589>
- Oshiro, L. M., Motta-Castro, A. R. C., Freitas, S. Z., Cunha, R. C., Dittrich, R. L., Meirelles, A. C. F., & Andreotti, R. (2015). *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* serodiagnosis in human immunodeficiency virus carriers. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 48, 568–572.
<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0151-2015>
- Pérez, J., Giangreco, S., & Guerrero, I. (2019). Neosporosis canina: la enfermedad y sus factores de riesgo. Tesis de Grado, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 1-35. <https://www.ridaa.unicen.edu.ar/handle/123456789/2246>
- Reyes, R. M., Álvarez, J. A., Rojas, C., Espinosa, E., García-Rubio, V. G., Ojeda-Carrasco, J. J., Reyes-Sandoval, R. M., Álvarez-Martínez, J. A., Rojas-Martínez, C., Espinosa-Ayala, E., García-Rubio, V. G., & Ojeda-Carrasco, J. J. (2017). Detección de *Neospora caninum*

por PCR anidada en leucocitos de bovinos productores de leche. Ecosistemas y recursos agropecuarios, 4(12), 563–570. <https://doi.org/10.19136/era.a4n12.1288>

Rodríguez, A. G. (2009). Neosporosis en la ganadería pecuaria en el Perú. Repositorio de Tesis - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1-91. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/13671>

Romero, J. J. (2006). Neosporosis bovina (*Neospora caninum*) descripción impacto económico y estrategias para su control. Ciencias Veterinarias, 24(1), 33–48. <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/article/view/4756>

Sánchez, E., Nina, M., Aguirre, P., Arce, M., Toro, N., & Vilela, R. (2014). Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico. Revista CON-CIENCIA, 2(1), 127–140. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652014000100014#:~:text=Amplificaci%C3%B3n%20Isot%C3%A9rmica%20Mediada%20por%20loop%20\(LAMP\)%20de%20%C3%A1cido%20nucleico%20amplifica,con%20actividad%20desplazante%20de%20cadena.](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652014000100014#:~:text=Amplificaci%C3%B3n%20Isot%C3%A9rmica%20Mediada%20por%20loop%20(LAMP)%20de%20%C3%A1cido%20nucleico%20amplifica,con%20actividad%20desplazante%20de%20cadena.)

Sánchez, Y. M., & Rodríguez, J. G. (2018). Identificación de lesiones histológicas coincidentes con *Neospora caninum* en tejido cerebral de fetos bovinos. Rev Salud Anim., 40(1). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2018000100008

Tranas, J., Heinzen, R. A., Weiss, L. M., & McAllister, M. M. (1999). Serological evidence of human infection with the protozoan *Neospora caninum*. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 6(5), 765-767. <https://doi.org/10.1128/cdli.6.5.765-767.1999>

Vargas, J. J., & Cortés, J. A. (2001). *Neospora caninum*, ¿Una zoonosis potencial? Rev. Salud Publica, 3(1), 89–93. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-00642001000100007#:~:text=Neospora%20caninum%20es%20un%20Coccidio,a%C3%B1os%2080%2C%20en%20Nuevo%20M%C3%A9xico.

Yucaza, M. G. (2015). Determinación de *Neospora caninum* en el Cantón Mejía: Relación canino–bovino. Universidad Central del Ecuador, 1–71. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/6676>

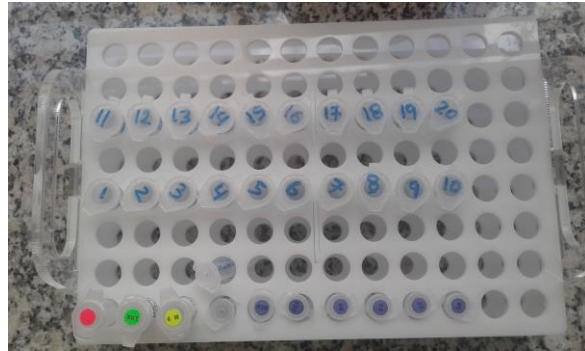
Zhang, Z. P., Zhang, Y., Liu, J. P., Zhang, J. T., An, Z. X., Quan, F. S., Zhang, L., Cai, X., Pu, SWJ. (2009). Codeposition of dNTPs Detection for Rapid LAMP-based Sexing of Bovine Embryos. *Reprod Dom Anim*, 44, 116–121; <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01006.x>

Anexos

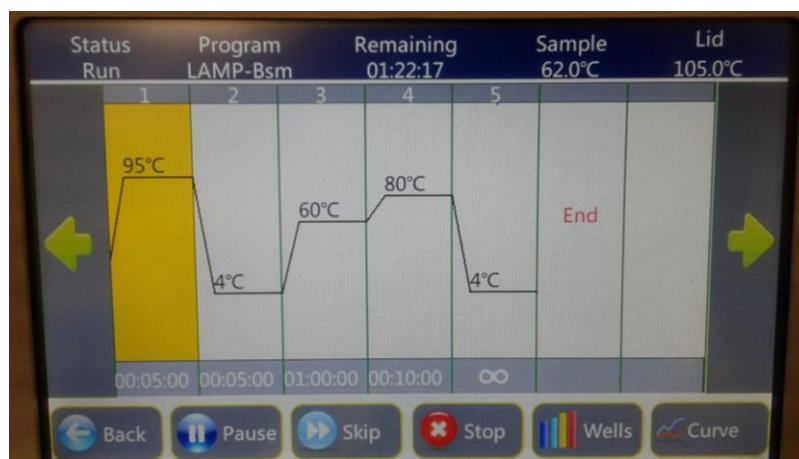
Anexo A. Selección de las muestras de ADN total de leche y encéfalo del banco de material genético del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.



Anexo B. Preparación de las muestras y reactivos para comenzar el ensayo LAMP.



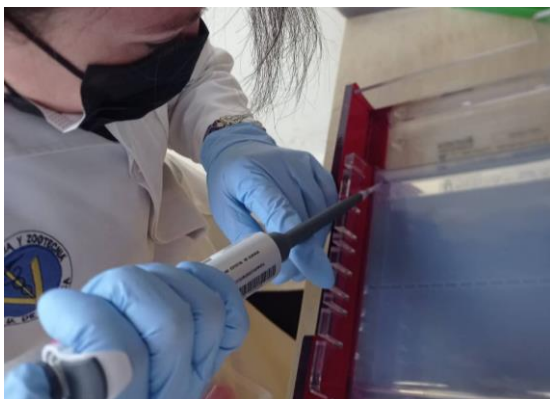
Anexo C. Amplificación de ADN de *N. caninum* mediante el ensayo LAMP en el termociclador.



Anexo D. Electroforesis en gel de agarosa_ TAE teñido con Bromuro de Etidio: Adición de 5 ul de la solución buffer de carga para ADN 6x a cada tubo de las reacciones del ensayo LAMP.



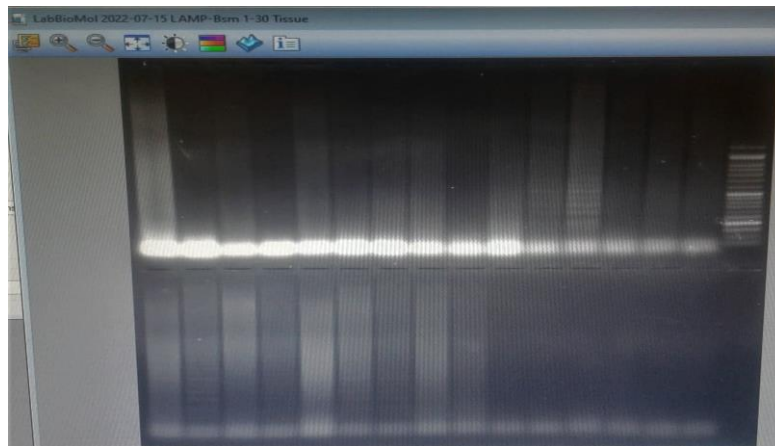
Anexo E. Electroforesis en gel de agarosa_ TAE teñido con Bromuro de Etidio: De la mezcla de cada una de las reacciones del ensayo LAMP se tomó 10ul y se inoculó en el pocillo correspondiente.



Anexo F. Electroforesis en gel de agarosa_ TAE teñido con Bromuro de Etidio: Se somete al mismo a 100 Voltios por el tiempo necesario de acuerdo a la longitud del gel (45 a 60 min).



Anexo G. Detección de los productos amplificados del ensayo LAMP.



Anexo H. Registro de cada electroforesis realizada para cada tipo de muestras y enzimas.

Nombre	Fecha de modificación
MEGA > 01- Antonio J. Vallecillo > 08- NcanDx project ver2017.10.06 > 04- Bsm-Bst Lech	
LabBioMol 2022-07-15 LAMP-Bsm 1-30 Tissue.scn	15/7/2022 11:37
LabBioMol 2022-07-15 LAMP-Bst 1-30 Tissue.scn	20/7/2022 14:13
LabBioMol 2022-07-17 LAMP-Bsm 1-30 Tissue.scn	14/7/2022 17:31
LabBioMol 2022-07-17 LAMP-Bsm 31-42 Tissue.scn	1/8/2022 11:49
LabBioMol 2022-07-17 LAMP-Bst 31-42 Tissue.scn	2/8/2022 15:37
LabBioMol 2022-08-08 LAMP-Bsm 31-58 Leche.scn	8/8/2022 17:27
LabBioMol 2022-08-08 LAMP-Bsm 59-79 Leche.scn	10/8/2022 16:44
LabBioMol 2022-09-15 LAMP-Bsm 43-63 Tissue.scn	15/9/2022 12:54
LabBioMol 2022-09-22 LAMP-Bsm 43-63 Tissue.scn	23/9/2022 13:37

Anexo I. Resultados estadísticos de McNemar.

Tablas de contingencia

Frecuencias absolutas

En columnas:BST (local)

BSM (comercial)	0	1	Total
0	28	2	30
1	9	11	20
Total	37	13	50

Frecuencias relativas por filas (expresadas como porcentajes)

En columnas:BST (local)

BSM (comercial)	0	1	Total
0	93.33	6.67	100.00
1	45.00	55.00	100.00
Total	74.00	26.00	100.00

Frecuencias relativas por columnas (expresadas como porcentajes)

En columnas:BST (local)

BSM (comercial)	0	1	Total
0	75.68	15.38	60.00
1	24.32	84.62	40.00
Total	100.00	100.00	100.00

Frecuencias relativas al total (expresadas como porcentajes)

En columnas:BST (local)

BSM (comercial)	0	1	Total
0	56.00	4.00	60.00
1	18.00	22.00	40.00
Total	74.00	26.00	100.00

Estadístico	Valor	p
Mc Nemar	4.45	0.0654
Coef.Conting.Cramer	0.38	
Kappa (Cohen)	0.51	
Coef.Conting.Pearson	0.48	

Anexo J. Resultados de estadístico descriptivo (SPSS).

Encéfalo BSM Comercial

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Negativo	30	60,0	60,0	60,0
	Positivo	20	40,0	40,0	100,0
	Total	50	100,0	100,0	

Encéfalo BST Local

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Negativo	37	74,0	74,0	74,0
	Positivo	13	26,0	26,0	100,0
	Total	50	100,0	100,0	

Leche BSM Comercial

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Negativo	50	100,0	100,0	100,0

Leche BST Local

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	Negativo	50	100,0	100,0	100,0