



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

**Evaluación del uso de dos proteínas recombinantes de
Neospora caninum para la detección de anticuerpos en perros
(*Canis lupus familiaris*)**

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista

AUTORAS:

Elena Estefanía Pacheco Pacheco

CI: 0105778773

Correo electrónico: stefyp1210@gmail.com

Magaly Tatiana León Lliguicota

CI: 0104594304

Correo electrónico: tatys155@hotmail.es

DIRECTOR:

MVZ. Antonio Javier Vallecillo Maza, PhD

CI: 0151059417

Cuenca - Ecuador

12-marzo-2020



RESUMEN:

La neosporosis es una enfermedad parasitaria producida por *Neospora caninum*, cuyo hospedador definitivo es el perro (*Canis lupus familiaris*), en el cual puede producir trastornos neuromusculares y en ciertos casos dermatitis, entre otras complicaciones. Además, los bovinos siendo hospedadores intermediarios, presentan abortos y mortalidad neonatal. El objetivo de este estudio fue evaluar la aplicación de las proteínas recombinantes NcSAG4 y NcGRA7 de *Neospora caninum*, en ensayos de ELISA y Western blot para identificar la presencia de anticuerpos en perros en contacto con bovinos y por lo tanto en riesgo de ingerir sus restos biológicos (fetos abortados y placentas) infectados con el parásito. Los ensayos de ELISA y Western Blot usando las proteínas recombinantes podrían ofrecer una herramienta eficaz de inmunodiagnóstico para la identificación de perros expuestos a *Neospora caninum*. Para esto se usaron sueros sanguíneos obtenidos de 100 perros, sin distinción de edad, raza y sexo, que residen en contacto con bovinos. Los resultados obtenidos mostraron un animal con presencia de anticuerpos tanto para la proteína recombinante NcGRA7 (ensayo de ELISA y Western blot) como para NcSAG4 (ensayo de Western blot); tres animales reconocieron el antígeno NcGRA7 (dos en ELISA y el tercero en ELISA y Western blot); y dos contra NcSAG4 (Western blot). En el análisis estadístico con la Prueba Q de Cochran se encontró que no existe diferencia estadística al aplicar estos métodos serológicos, es decir que ambas técnicas utilizando las dos proteínas recombinantes se comportan de manera similar para la detección de anticuerpos.

Palabras clave: *Neospora caninum*. Perros. Elisa. Western blot. NcGRA7. NcSAG4.



ABSTRACT:

Neosporosis is a parasitic disease caused by *Neospora caninum*, whose definitive host is the dog (*Canis lupus familiaris*), this can cause neuromuscular disorders and in some cases dermatitis, among other complications. Besides, cattles as intermediate hosts, have abortions and neonatal mortality. The objective of this study was to evaluate the application of the NcSAG4 and NcGRA7 recombinant proteins of *Neospora caninum*, in ELISA and Western blot assays to identify the presence of antibodies in dogs in contact with cattle and therefore at risk of ingesting their biological remains (aborted fetuses and placentas) infected with the parasite. ELISA and Western Blot assays using recombinant proteins could offer an effective immunodiagnostic tool for the identification of dogs exposed to *Neospora caninum*. For this, blood sera obtained from 100 domestic canines were used, regardless of age, race and sex, residing in contact with cattle. The results obtained showed an animal with the presence of antibodies both for the NcGRA7 recombinant protein (ELISA and Western blot assays) and for NcSAG4 (Western blot assay); three animals recognized the NcGRA7 antigen (two in ELISA and the third in ELISA and Western blot); and two against NcSAG4 (Western blot). In the statistical analysis with the Cochran Q Test it was found that there is no statistical difference when applying these serological methods, that is to say that both techniques using the two recombinant proteins behave similarly for the detection of antibodies.

Keywords: *Neospora caninum*. Dogs. Elisa. Western blot. NcGRA7. NcSAG4.



INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN:	2
ABSTRACT:	3
INDICE DE CONTENIDO	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE ANEXOS	7
AGRADECIMIENTOS	12
DEDICATORIA	13
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	14
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	16
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1 GENERALIDADES	18
2.2 ANTECEDENTES.....	18
2.3 MORFOLOGÍA	18
2.4 PROTEÍNAS DE <i>N. CANINUM</i>	20
2.5 CICLO BIOLÓGICO.....	21
2.6 TRANSMISIÓN.....	22
2.7 SIGNOS CLÍNICOS.....	23
2.8 DIAGNÓSTICO	24
2.8.1 Coproparasitoscopia	24
2.8.2 Histopatología	24



2.8.3	Inmunohistoquímica	24
2.8.4	Reacción en cadena de polimerasa (PCR).....	25
2.8.5	Inmunofluorescencia indirecta.....	25
2.8.6	Enzimoinmunoensayo o ELISA	25
2.8.7	Western blot o inmunoblot.....	26
2.9	MEDIDAS DE CONTROL	26
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS		27
3.1	Área de estudio y unidad de análisis	27
3.2	Recolección y transporte de muestras	27
3.2.1	Materiales de trabajo.....	27
3.2.2	Materiales biológicos.....	27
3.2.3	Materiales químicos	27
3.2.4	Procedimiento	28
3.3	Obtención de suero sanguíneo de las muestras de sangre	28
3.3.1	Materiales físicos	28
3.3.2	Materiales biológicos.....	28
3.3.3	Materiales químicos	28
3.3.4	Procedimiento	29
3.4	Ensayo de ELISA	29
3.4.1	Materiales físicos	29
3.4.2	Materiales biológicos.....	29
3.4.3	Materiales químicos	30
3.4.4	Procedimiento	30
3.5	Ensayo de Western Blot	31
3.5.1	Materiales físicos	31
3.5.2	Materiales biológicos.....	31
3.5.3	Materiales químicos	32



3.5.4	Procedimiento	33
3.6	Análisis estadístico	37
CAPÍTULO IV: RESULTADOS		38
4.1	Ubicación geográfica mediante coordenadas de las muestras tomadas	38
4.2	Recolección y transporte de muestras sanguíneas y obtención de los sueros 38	
4.3	Ensayo de ELISA	38
4.4	Ensayo de Western Blot	40
4.5	Porcentajes de resultados al aplicar los ensayos de ELISA y Western blot con las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 para la identificación de anticuerpos contra <i>Neospora Caninum</i> en sueros sanguíneos de perros.	42
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN		43
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES		45
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES		45
CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		46
CAPÍTULO IX: ANEXOS		52



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de los resultados obtenidos con la aplicación de los ensayos de ELISA y Western blot con las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* en 100 muestras de suero sanguíneo de perros (Q de Cochran, $p = 0,128$). 42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estadios parasitarios de *N. caninum*. 19

Figura 2. Estructura de Apicomplexa: 1.- anillo polar, 2.- conoide, 3.- micronemas, 4.- roptrias, 5.- núcleo, 6.- nucleolo, 7.- mitocondria, 8.- anillo posterior, 9.- microtúbulo , 10.- aparato de Golgi , 11.- microporo 19

Figura 3. Ciclo biológico de *N. caninum* 22

Figura 4. Resultados obtenidos de la aplicación del ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos de *N. caninum* empleando las proteínas recombinantes NcSAG4 y NcGRA7 en 100 muestras de suero sanguíneo de perros. 39

Figura 5. Reconocimiento de la proteína recombinante NcSAG4 por los anticuerpos de los perros mediante el ensayo de Western blot..... 40

Figura 6. Resultados obtenidos de la aplicación del ensayo de Western blot para la detección de anticuerpos de *N. caninum* empleando las proteínas recombinantes NcSAG4 y NcGRA7 en 100 muestras de suero sanguíneo de perros..... 41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Registro de toma de muestras, coordenadas, edad, sexo y resultados de los ensayos de ELISA y Western blot con las respectivas proteínas recombinantes (NcGRA7 y NcSAG4)..... 52



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Elena Estefanía Pacheco Pacheco en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación del uso de dos proteínas recombinantes de *Neospora caninum* para la detección de anticuerpos en perros (*Canis lupus familiaris*)", 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, 12 de marzo de 2020

Elena Estefanía Pacheco Pacheco

C.I: 0105778773



Cláusula de Propiedad Intelectual

Elena Estefanía Pacheco Pacheco, autora del trabajo de titulación "Evaluación del uso de dos proteínas recombinantes de *Neospora caninum* para la detección de anticuerpos en perros (*Canis lupus familiaris*)", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 12 de marzo de 2020

Elena Estefanía Pacheco Pacheco

C.I: 0105778773



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Magaly Tatiana León Lliguicota en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Evaluación del uso de dos proteínas recombinantes de *Neospora caninum* para la detección de anticuerpos en perros (*Canis lupus familiaris*)”, 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, 12 de marzo de 2020

Magaly Tatiana León Lliguicota

C.I: 0104594304



Cláusula de Propiedad Intelectual

Magaly Tatiana León Lliguicota, autora del trabajo de titulación “Evaluación del uso de dos proteínas recombinantes de *Neospora caninum* para la detección de anticuerpos en perros (*Canis lupus familiaris*)”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 12 de marzo de 2020

Magaly Tatiana León Lliguicota

C.I: 0104594304



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos expresar nuestro agradecimiento a Dios y a la Virgen por bendecirnos cada día, darnos fortaleza y permitirnos culminar una meta más en nuestras vidas.

A nuestra familia por la confianza y el apoyo incondicional durante toda nuestra carrera universitaria. Gracias por ser un ejemplo de constancia y dedicación.

A los docentes de la Universidad de Cuenca, quiénes nos formaron profesionalmente en lo que nos apasiona y nos compartieron valiosas lecciones de vida.

De manera especial queremos expresar nuestro agradecimiento a nuestro director de tesis Dr. Antonio Vallecillo por brindarnos la oportunidad de acudir a su capacidad y conocimiento científico, así como también, habernos compartido sus conocimientos de manera generosa y desinteresada; darnos su apoyo y guía para que fuese posible la realización de este trabajo de titulación.

Finalmente, al Dr. Guillermo Guevara por la paciencia y disponibilidad que ha demostrado a lo largo de nuestro trabajo.

Tatiana León y Estefanía Pacheco.



DEDICATORIA

Este trabajo de titulación va dedicado a mi familia, especialmente a mis padres Hernán y Jema, quiénes son un pilar fundamental en mi vida y siempre me han brindado su amor y colaboración incondicional durante todo este largo proceso.

A mi hermano Diego, quién con su ejemplo, me ha demostrado que todo es posible mientras una persona sea perseverante y mantenga la fe en Dios.

A mi novio Marcos que constantemente ha sabido alentarme y apoyarme en cada decisión que he tomado.

Estefanía Pacheco.

Este proyecto de tesis se lo dedico a cada uno de mis seres queridos ya que sus consejos y palabras de aliento han sido siempre un impulso para salir adelante en las distintas etapas de mi vida.

A mis padres Marco y Carmen, y a mi hermano Oscar que han sido pilares fundamentales en mi desarrollo personal y profesional.

A mi padre porque a través de su esfuerzo me ha permitido alcanzar esta meta. A mi madre que ha estado siempre a mi lado ayudándome a construir mis sueños, brindándome su apoyo y amor incondicional.

Tatiana León.

**ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA**

Abreviatura o símbolo:	Significado:
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
mm	Milímetro
nm	Nanómetro
ml	Mililitros
µl	Microlitro
x g	Gravedad
mM	Milimolar
g	Gramo
µg	Microgramo
mg	Miligramo
ng	Nanogramo
kDa	Kilodalton
v/v	Volumen a Volumen
No. Cat.	Número de catálogo
Tris	Trisaminometano
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
HCl	Ácido Clorhídrico
NaCl	Cloruro de Sodio
KCl	Cloruro de Potasio
NaH ₂ PO ₄	Bifosfato de Sodio
KH ₂ PO ₄	Bifosfato de Potasio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogeno
PBS	Solución Buferada de Fosfatos



SDS PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecilsulfato sódico
BSA	Albumina Sérica Bovina
HRP	Peroxidasa de Rábano
TEMED	Tetrametilendiamina
PVDF	Polifluoruro de Vinilideno
DAB	Diaminobencidina



CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La presente investigación será de utilidad para el control de riesgos en los perros expuestos a *Neospora caninum* (*N. caninum*) no sólo por las pérdidas económicas que producen al disminuir la eficacia productiva y reproductiva del hato ganadero sino también porque compromete la salud de la especie canina pudiendo provocar su muerte. Por tal motivo, este estudio pretende generar datos necesarios para el desarrollo de futuras investigaciones mediante el uso de ensayos de ELISA y Western blot con las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 de *N. caninum*.

En el Ecuador, generalmente en la región Sierra es frecuente que en las ganaderías exista la presencia de la especie canina para compañía y ayuda en las actividades cotidianas del hato, debido a esto, perros infectados con *N. caninum* pueden contribuir a la diseminación de la enfermedad a los bovinos.

En la actualidad, existen varias pruebas de diagnóstico para *N. caninum*, las cuales pueden ser directas o indirectas. Estudios realizados en bovinos, como el de Aguado *et al.* (1) mediante el test de ELISA empleando las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 han permitido determinar su utilidad como medio de inmunodiagnóstico para detectar seroconversión. Así mismo, han sido reconocidas por lo menos 20 proteínas de *N. caninum* en el intervalo de los 16 a 80 kDa procedentes de sueros de diferentes especies mediante la técnica de Western blot. Respecto a la especie bovina, se ha reconocido mediante la técnica antes mencionada 4 antígenos inmunodominantes en sueros de vacas con infección natural (2). Sin embargo, no existen estudios en el Ecuador que hayan demostrado la capacidad de estas proteínas para ser reconocidas por los anticuerpos de los perros expuestos a *N. caninum*.

Por lo anterior descrito y debido al alto porcentaje que existe de animales infectados con este protozoo, es necesario desarrollar nuevas bases de diagnóstico que ayuden al control adecuado y a la identificación correcta de los perros expuestos a *N. caninum* para evitar así la propagación masiva de la enfermedad tanto a la especie canina como a la bovina. Los resultados e información obtenida en esta investigación ofrecerán beneficios a la medicina veterinaria para futuras pruebas validadas.



OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la aplicación de las proteínas recombinantes NcSAG4 y NcGRA7 de *Neospora caninum*, en ensayos de ELISA y Western blot para identificar la presencia anticuerpos en perros (*Canis lupus familiaris*) domésticos del sector rural de la ciudad de Cuenca, provincia del Azuay.

Objetivos específicos

- Identificar la presencia de anticuerpos en perros (*Canis lupus familiaris*) domésticos con capacidad de reconocer a las proteínas recombinantes NcSAG4 y NcGRA7 de *Neospora caninum* en ensayos de ELISA y Western blot.
- Comparar la capacidad de las proteínas recombinantes NcSAG4 y NcGRA7 de *Neospora caninum* para identificar la presencia de anticuerpos en muestras de sueros de perros (*Canis lupus familiaris*) en ensayos de ELISA y Western blot para su potencial aplicación en el inmunodiagnóstico de ésta parasitosis.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las proteínas recombinantes NcSAG4 y NcGRA7 de *Neospora caninum*, son reconocidas por los anticuerpos generados por los perros (*Canis lupus familiaris*) domésticos expuestos a éste parásito y pueden emplearse en el desarrollo de herramientas inmunodiagnóstica?



CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 GENERALIDADES

N. caninum pertenece al phylum Apicomplexa, clase Sporozoea, subclase Coccidia, orden Eucoccidia, suborden Eimeriina, familia Sarcocystidae y género Neospora. La neosporosis es una enfermedad cosmopolita causada por un protozoo llamado *N. caninum*, el cual produce infecciones en perros, bovinos y otros herbívoros; se localiza en el intestino tanto de perros como de bovinos, también puede encontrarse en hígado, pulmón, cerebro, placenta y músculos (3).

Este protozoo afecta primordialmente a cachorros neonatos y en algunas ocasiones se evidencia signología en perros geriátricos inmunocomprometidos (4).

Experimentalmente se ha comprobado su patogenicidad en otras especies (ratones, aves, gatos y primates) (5).

2.2 ANTECEDENTES

En 1984 *N. caninum* se describió por primera vez en Noruega en perros que manifestaban trastornos neuromusculares después del nacimiento (6), el agente causal identificado tuvo similitud con *T. gondii*. En 1988, se aisló el protozoo en cultivo celular y en el ratón a partir de muestras de cerebro y músculos de perros infectados y se propuso el nombre de *N. caninum* comprobados mediante los postulados de Koch (7,8).

Posterior a que *N. caninum* fue reconocido como causa de enfermedad en los perros, se diagnosticaron en fetos bovinos abortados momificados, y en terneros con parálisis neonatal. La neosporosis en bovinos ha sido reconocida en diferentes lugares del mundo, y en la actualidad se ha comprobado que la especie canina y la bovina se infectan con la misma especie de protozoo (9).

2.3 MORFOLOGÍA

Se han identificado tres estadios diferentes de *N. caninum*, taquizoitos, quistes tisulares con bradizoitos en su interior y ooquistes (10) (**Figura 1**). Tanto taquizoitos como bradizoitos presentan una morfología propia de las fases infectantes de los Apicomplexa, presentando las siguientes estructuras: dos anillos polares, un conoide, una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, 22 microtúbulos subpeliculares, micronemas, roptrias, una mitocondria, un núcleo, el aparato de Golgi, ribosomas,

polisomas, gránulos densos, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, vesículas, retículo endoplásmico liso y rugoso y un poro posterior (11,12) (**Figura 2**).

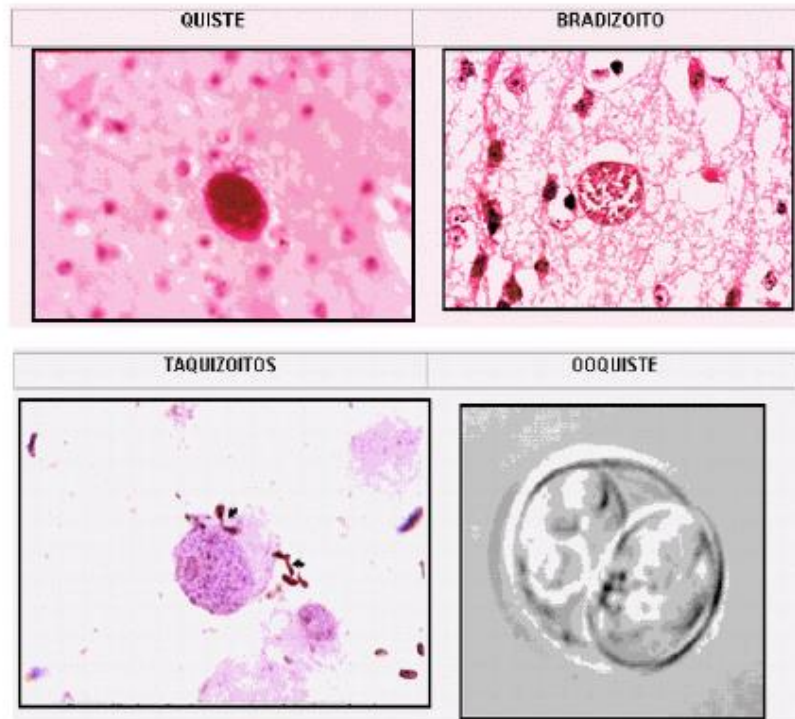


Figura 1. Estadios parasitarios de *N. caninum*. (13)

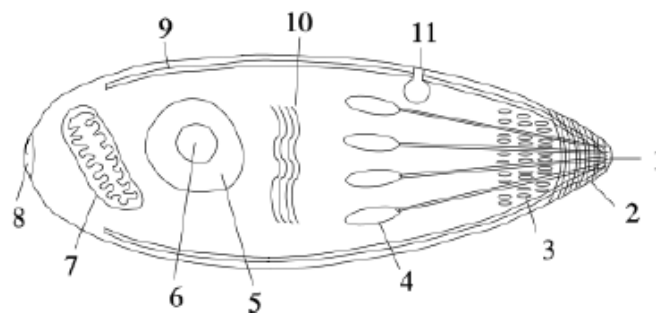


Figura 2. Estructura de Apicomplexa: 1.- anillo polar, 2.- conoide, 3.- micronemas, 4.- roptrias, 5.- núcleo, 6.- nucleolo, 7.- mitocondria, 8.- anillo posterior, 9.- microtúbulo , 10.- aparato de Golgi , 11.- microporo (13).

Los taquizoitos se encuentran en el hospedador intermediario y en forma intracelular, a nivel citoplasmático en la vacuola parasitófaga, puede hospedar células como neuronas,



macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos y hepatocitos. Los taquizoitos están presentes durante la fase aguda de la infección y la formación de quistes (14,15).

Los taquizoitos son de morfología ovoide y su tamaño oscila entre 3-7 μm de longitud y 1-5 μm de anchura. En su citoplasma se encuentran hasta 150 micronemas, los cuales pueden estar orientados de forma perpendicular a la membrana interna, además poseen de 8 a 18 roptrias que contienen material muy electrodensito y son de 2 a 4 veces más gruesas que los micronemas (11,16).

Los bradizoitos presentan una forma de multiplicación lenta que desarrollan dentro de los quistes tisulares. Miden 7 μm de longitud x 1,5 μm de ancho aproximadamente. Estos se distinguen de los taquizoitos en que son más delgados, tienen menor cantidad de roptrias, más gránulos de amilopectina P.A.S. positivos y el núcleo es de localización terminal o subterminal (11).

Los quistes tisulares presentan una forma redondeada u oval y pueden medir hasta 107 μm de longitud (17). Su pared, llega a medir más de 4 μm de grosor y está formada por una pared quística primaria que consiste en una única membrana que se origina de la membrana de la vacuola parasitófora y una capa granular gruesa, la cual contiene vesículas electrodensas incluidas dentro de una matriz electrodensa (16).

Durante las fases iniciales de la formación del quiste presenta un tamaño de cerca de 17 μm con una pared delgada y regular, sin embargo, los quistes maduros presentan mayor tamaño y su pared es más gruesa con un gran número de invaginaciones; se pueden presentar hasta 200 bradizoitos dentro de éstos quistes (11,16).

En el perro se han aislado ooquistes de *N. caninum* procedentes de infecciones experimentales, en donde morfológicamente, se han observado que tienen forma esférica y su tamaño es de 11,7 μm de longitud y 11,3 μm de anchura. La pared del ooquiste es lisa, presenta un grosor de 0,6-0,8 μm y no contiene el micropilo. En su interior se encuentran dos esporoquistes elipsoidales (8,4 μm de longitud por 6,1 μm de anchura). A su vez, en el interior de cada esporoquiste se encuentran cuatro esporozoítos (6,5 μm de longitud por 2,0 μm de anchura) y el cuerpo residual esporoquístico (18).

2.4 PROTEÍNAS DE *N. CANINUM*

La identificación, caracterización y localización de los antígenos del parásito ayudan a determinar el mecanismo de adhesión, invasión y multiplicación de *N. caninum*,



mediante procesos de motilidad, adhesión a moléculas de superficie y penetración a la célula hospedadora. Para ello cuentan con un gran número de proteínas específicas que son secretadas por organelas como los gránulos densos, roptrias y micronemas (13).

Los gránulos densos se localizan en el extremo anterior del parásito. Las moléculas secretadas se dirigen hacia la superficie del parásito, facilitando la interacción de taquizoitos y bradizoitos con la célula hospedadora y su posterior invasión, o son secretadas dentro de la vacuola parasitófora durante y después de la penetración en la célula hospedadora. La secreción de estas proteínas tiene lugar durante el periodo de multiplicación del parásito. Las proteínas de gránulos densos son NcGRA6, NcGRA7 y NcGRA2. La proteína NcGRA7 de 33 kDa podría considerarse como indicador de una infección aguda (13).

Las proteínas que forman parte de la superficie celular son imprescindibles en la supervivencia del parásito, son responsables de iniciar las interacciones entre el patógeno y las moléculas de la superficie de la célula y estimular la respuesta inmune desarrollada por el hospedador. Los antígenos de superficie se designan como SAG o SRS, donde los que destacan son NcSAG1, NcSAG4 y NcSRS2. La proteína NcSAG4 de 19 kDa se ha identificado en el estadio de bradizoito y estaría relacionada con el establecimiento de una infección crónica (2,19).

2.5 CICLO BIOLÓGICO

Este parásito presenta tres formas infectantes a lo largo de su ciclo biológico en las diferentes especies afectadas: los esporozoítos (en los ooquistes), los taquizoítos (multiplicación rápida) y los bradizoítos (multiplicación lenta, que formando quistes tisulares) y desarrollando las fases de reproducción asexual (merogonia) y sexual (gametogonia) (20). Los perros pueden ser hospederos intermediarios o definitivos, estos adquieren la infección principalmente por la ingestión de quistes tisulares que contienen taquizoítos y/o bradizoítos de los hospedadores intermediarios infectados, especialmente de bovinos. En el intestino del perro se desarrolla la fase sexual con la formación de ooquistes inmaduros los cuales se eliminan de cinco a trece días en las heces durante una a tres semanas, en este periodo no son infectantes sino que requieren de uno a tres días de esporulación en el medio exterior, formándose en su interior dos esporocistos con cuatro esporozoítos cada uno. Los hospedadores

intermediarios se infectan cuando ingieren accidentalmente estos ooquistes maduros (esporulados) con el alimento o el agua (21,22).

Los esporozoitos se liberan en el intestino, lo atraviesan, penetran en células de distintos tejidos, donde se forman y se multiplican los taquizoítos y/o bradizoítos que pueden encontrarse en los tejidos de todos los hospedadores intermediarios y que al ser ingeridos por el perro reinician el ciclo (5) (**Figura 3**).

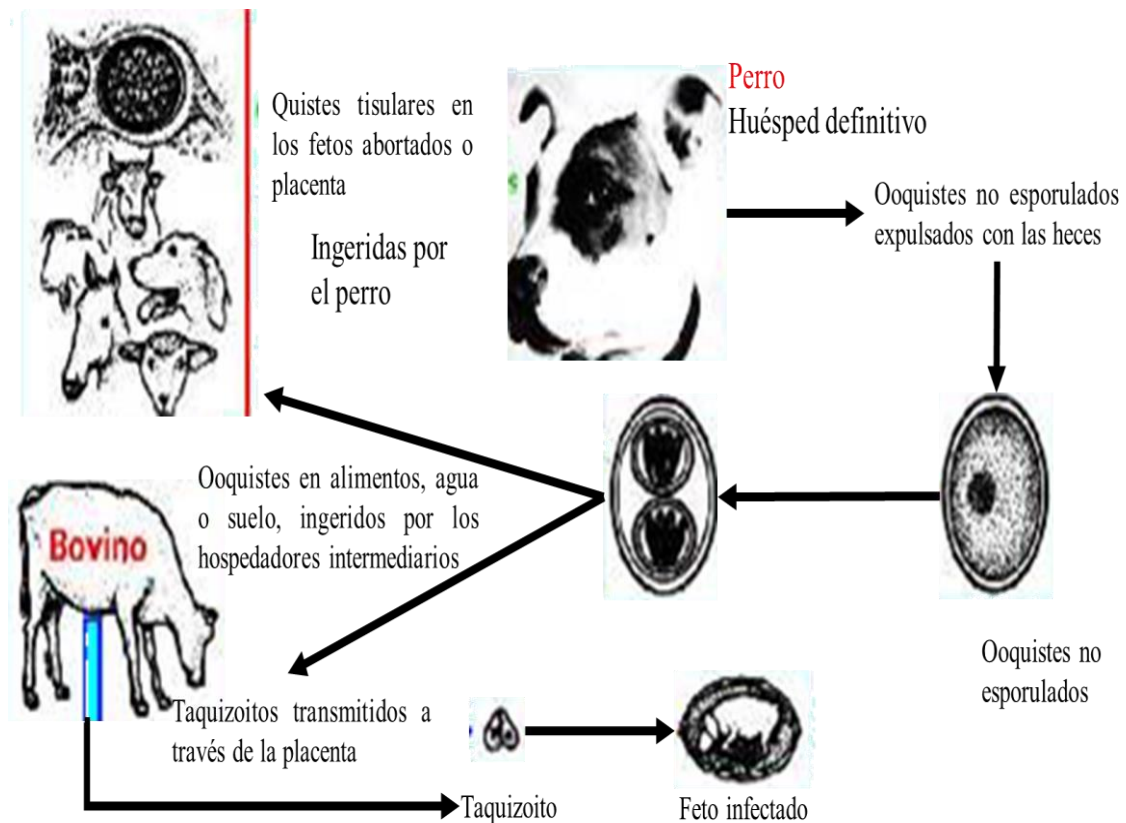


Figura 3. Ciclo biológico de *N. caninum* (23).

2.6 TRANSMISIÓN

En bovinos una de las principales vías de transmisión de la infección y consecuentemente se mantenga *N. caninum* circulando durante generaciones, es la vía vertical. La transmisión transplacentaria de parásitos tisulares de vacas infectadas a sus fetos es posible que se suceda con mucha frecuencia (23).

La infección por transmisión horizontal del ganado bovino adulto tiene lugar luego que el hospedador definitivo, principalmente animales del género *Canis* eliminan ooquistes



que contaminan pastos, forrajes, agua de bebida y piensos almacenados (20). Otra de las posibles rutas de transmisión horizontal es a través del consumo de leche. López *et al.* (2007) muestran que esta vía de transmisión es posible darse al alimentar terneros recién nacidos con calostro conteniendo taquizoítos de *N. caninum*, y se mostró que los terneros seroconvirtieron y pudo demostrarse la presencia de ADN de *N. caninum* por la técnica de PCR en material procedente de cerebro de los terneros (24).

En la especie canina la transmisión horizontal es dada por ingestión de tejidos contaminados (fetos abortados y placentas) procedente de animales infectados, calostro o leche con bradizoitos y/o taquizoitos de algún hospedero intermediario (20). El perro también puede actuar como hospedero intermediario al consumir ooquistes en la comida o el agua (4). Por otra parte, existen estudios que han demostrado que transmisión vertical es poco efectiva para mantener en circulación dentro de la población la infección en los perros (4), sin embargo, las perras seropositivas, con infección subclínica o infectadas de manera crónica, pueden transmitir la infección en forma vertical a varias camadas sucesivas, y a su vez, ésta infección se puede repetir en la siguiente generación. La afección de los cachorros de la misma camada es variable, ya que no necesariamente toda la camada nacida de una hembra sin signología clínica pero infectada desarrolla anticuerpos anti-*N. caninum* o presenta signos de la enfermedad (24).

2.7 SIGNOS CLÍNICOS

En la especie bovina un signo clínico común en vacas infectadas es la presencia de abortos en el periodo comprendido entre los 4 a 6 meses de gestación; el material abortado se caracteriza por la expulsión de un feto usualmente en estado autolítico pudiendo presentar grados variables de momificación y que por lo general lo cursan sin retención placentaria. Asimismo, *N. caninum* puede provocar abortos repetidos en gestaciones consecutivas o intercalar abortos con gestaciones normales, con el nacimiento de terneros infectados (18, 19).

En cuanto a los perros, la transmisión de la madre al feto se da en el último tercio de gestación y los cachorros infectados presentarán los signos clínicos a partir de las 5 a 7 semanas tras el nacimiento, manifestando trastornos neuromusculares progresivos, principalmente consecuencia de lesiones de encefalomiелitis, polirradiculoneuritis y polimiositis; además de paresia que avanza a parálisis en los miembros posteriores, y los miembros anteriores pueden afectarse con hiperextensión rígida de los cuádriceps,



respuesta de dolor a la palpación de los mismos y de los músculos lumbares. Finalmente, los signos más tardíos corresponden a las consecuentes lesiones de atrofia de los músculos de la cabeza y cuello (4,26).

En perros adultos los signos clínicos son más variados y menos severos, presentando polimiositis, dermatitis (prurítica, ulcerativa y fistulosa), neumonía, miocarditis, pancreatitis e infección generalizada. No se sabe si la enfermedad clínica en perros gerontes se debe a la infección primaria aguda o exacerbación de un proceso infeccioso de tipo crónico (24).

2.8 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza por métodos directos y métodos indirectos, entre los primeros tenemos:

2.8.1 Coproparasitoscopia

Es una técnica de baja especificidad debido a que los ooquistes de *N.caninum* son difícil distinguibles de los quistes de otros coocidios (*Hammondia heydorni*, *Hammondia hammondi* y *T. gondii*). Se utiliza la técnica de flotación mediante soluciones con Sacarosa o con Sulfato de zinc para realizar su aislamiento en heces, sin embargo en perros que presentan signos clínicos de la infección no es posible realizar esta técnica ya que estos no eliminan ooquistes, por lo que la coproparasitoscopia es útil solamente para establecer un perfil epidemiológico (27).

2.8.2 Histopatología

Los cortes histopatológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina, permiten la observación de quistes tisulares y taquizoítos asociados o no a lesiones en sistema nervioso, músculo, hígado, pulmón y otros tejidos. En el animal vivo, pueden realizarse biopsias de los músculos afectados, lo cual dará un diagnóstico definitivo si se encuentra el parásito. Sin embargo, esta técnica suele ser muy traumática y/o solo es aplicable *post-mortem* (28).

2.8.3 Inmunohistoquímica

Esta técnica permite la detección de diferentes estadios del parásito en tejidos de animales infectados mediante la utilización de anticuerpos específicos. Se utiliza para la detección de quistes o taquizoítos en tejidos fijados con Formol. La inmunohistoquímica permite detectar taquizoítos en los tejidos, que son difíciles de hallar con las técnicas de



coloración de rutina (Hematoxilina-Eosina), debido a que las lesiones histopatológicas que produce este parásito es similar a las de *T. gondii* (20, 15).

2.8.4 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

La técnica de PCR puede utilizarse para verificar la presencia de estos parásitos en los tejidos a través de la identificación de un fragmento de ADN específico, lo que a su vez también permite diferenciarlos entre sí utilizando *primers* u oligonucleótidos específicos. La desventaja que presenta es que puede determinar un resultado falso negativo, ya que se procesa una pequeña cantidad de muestra (5).

Lo que se refiere a los métodos indirectos estos implican la detección de anticuerpos anti-*N. caninum* en hospedadores tanto definitivos como intermediarios. Entre los principales tenemos la inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoensayo o ELISA.

2.8.5 Inmunofluorescencia indirecta

Se utilizan taquizoítos enteros fijados a un portaobjetos como antígeno que se enfrenta al suero problema. Para revelar la unión se utiliza un conjugado o anticuerpo secundario a la inmunoglobulina unido a una sustancia fluorescente o fluorocromo, que al ser excitada por luz ultravioleta, emite un haz de luz de mayor longitud de onda, que se visualiza con un microscopio de fluorescencia (24).

2.8.6 Enzimoimmunoensayo o ELISA

En esta prueba la unión antígeno-anticuerpo se revela por un conjugado unido a una enzima que al reaccionar con su sustrato específico, un cromógeno, produce una reacción coloreada. Es una prueba de alta sensibilidad cuantitativa o analítica ya que permite la detección de cantidades pequeñas de complejos antígeno-anticuerpo. La lectura de la reacción se hace con un espectrofotómetro, por lo que permite una lectura objetiva de los resultados. Otra ventaja que presenta es que permite analizar un número elevado de muestras a la vez (21, 22).

Las pruebas ELISA basadas en la proteína recombinante presentan niveles mayores de sensibilidad y especificidad que las basadas en lisados de taquizoitos completos (31). Esta técnica, utiliza los anticuerpos a los que se han enlazado covalentemente las enzimas de modo que quedan sin alteración las propiedades catalíticas de la enzima y



la especificidad del anticuerpo. Las enzimas enlazadas, típicamente incluyen peroxidasa, fosfatasa alcalina y galactosidasa, todas las cuales catalizan reacciones cuyos productos son de color y se pueden determinar en cantidades muy pequeñas (32).

2.8.7 Western blot o inmunoblot

La unión antígeno-anticuerpo se produce mediante una membrana de nitrocelulosa donde previamente se ha transferido las proteínas fraccionadas de *N. caninum*, luego de que se realice una corrida electroforética de las mismas en un gel de poliacrilamida. Los diversos fragmentos antigénicos se enfrentan con los sueros sanguíneos, y si éstos reaccionan con uno o varias porciones se pueden observar al revelar la reacción. Esta prueba presenta una alta especificidad y es utilizada conjuntamente con otras pruebas como la de ELISA (33,34).

Estudios realizados por Schares *et al.* (1998) el Western blot podría sustituir a la IFI ya que presenta una mayor sensibilidad en comparación con IFI y ELISA sin afectar su alta especificidad (35).

2.9 MEDIDAS DE CONTROL

Ya que se ha comprobado una asociación epidemiológica entre la especie canina y los bovinos con serología positiva, es recomendable disminuir el contacto entre estos animales, por lo que se debería aislar a los perros en lugares con cercos para impedir la difusión de sus heces en el medio ambiente, así mismo se debería impedir el acceso de perros a lugares destinados al depósito de alimento para el ganado (4,36).

Además, evitar que los perros tengan contacto con el material abortado (fetos, placenta etc.) ya que se ha evidenciado que la transmisión postnatal es a través de la ingestión de carne cruda, por lo que es aconsejable que los dueños de los perros cocinen la carne completamente antes de dársela (19,37).

Para impedir la transmisión vertical las perras que hayan tenido camadas con afectación clínica no deben integrar el plantel de reproductores, debido a que como ocurren infecciones transplacentarias repetidas, es mayor el riesgo para los cachorros nacidos de perras que ya tuvieron camadas infectadas. Es importante realizar el examen serológico de los perros dos veces por año para asegurarse de su negatividad (5).



CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio y unidad de análisis

Las muestras sanguíneas fueron tomadas de 100 perros seleccionados aleatoriamente, que residen junto a bovinos de las parroquias aledañas a la ciudad de Cuenca y cercanas al camal municipal de Cuenca-Azuay. En el estudio se incluyó perros que se encuentran en contacto directo con bovinos o restos de los mismos, para favorecer tener muestras serológicas de perros expuestos a *N. caninum* por el posible consumo de restos de bovinos infectados, sin distinguir 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
Cinta para rotular
Tubos sin anticoagulante
Rasuradora
Tijeras
Torundas de algodón
Jeringas de 5 ml
Gel refrigerante
Cooler

3.2.2 Materiales biológicos

Perros incluidos en el estudio

3.2.3 Materiales químicos

Alcohol etílico al 70%



3.2.4 Procedimiento

Paso 1.- Una vez sujeto el animal, se procedió a la asepsia de la zona correspondiente a la vena cefálica con Etanol al 70%.

Paso 2.- Se realizó una punción en la vena cefálica para la recolección de al menos 2 ml de sangre de cada perro con la ayuda de tubos con vacío y sin anticoagulante.

Paso 3.- Una vez colectada la muestra, los tubos fueron colocados con la tapa hacia abajo en un ángulo de entre 25° a 30°, durante aproximadamente 20-30 min, a temperatura ambiente y protegidos del Sol, para permitir la formación del coágulo y liberación del suero sanguíneo.

Paso 4.- Con el coágulo formado, para el transporte, los tubos fueron colocados de forma vertical en el cooler con gel refrigerante lo cual permitió una adecuada conservación de las muestras.

Paso 5.- Las muestras se trasladaron al laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca, en donde se conservaron en refrigeración (± 4 °C) por un periodo máximo de una semana para la obtención del suero sanguíneo.

3.3 Obtención de suero sanguíneo de las muestras de sangre

3.3.1 Materiales físicos

Micropipetas de varios volúmenes y sus puntas

Tubos Eppendorf

Palillos

Marcadores

Papel absorbente

Gradillas

Microcentrífuga

Refrigerador (± 4 °C)

Ultracongelador (-80 °C)

3.3.2 Materiales biológicos

Muestras de sangre colectadas en tubos sin anticoagulante

3.3.3 Materiales químicos

Alcohol etílico al 70%



3.3.4 Procedimiento

Paso 1.- Para la obtención del suero de las muestras de sangre almacenadas en refrigeración, en posición vertical con la tapa hacia arriba para favorecer la retracción del coágulo y liberación del suero, se procedió cuidadosamente a retirar y desechar el coágulo con ayuda de un palillo.

Paso 2.- Se tomó de cada tubo $\pm 500 \mu\text{l}$ de suero sanguíneo y se colocó en los tubos Eppendorf de 1.5 ml, previamente identificados.

Paso 3.- Para eliminar lo más posible los glóbulos rojos liberados del coágulo, las muestras de suero sanguíneo fueron centrifugadas a $4,500 \times g$, por 10 min a temperatura ambiente ($\pm 23 \text{ }^\circ\text{C}$).

Paso 4.- Posteriormente, se tomó $\pm 400 \mu\text{l}$ de cada muestra de suero sanguíneo y se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml, previamente rotulados.

Paso 5.- Las muestras de suero sanguíneo se mantuvieron en congelación ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) hasta su uso en los ensayos de ELISA y Western blot.

3.4 Ensayo de ELISA

3.4.1 Materiales físicos

Placas de 96 pozos

Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas

Recipientes de vidrio para la preparación de soluciones

Agitador orbital

Potenciómetro (pHmetro)

Balanza analítica

Lector de placas de ELISA

Computadora

3.4.2 Materiales biológicos

Muestras de suero sanguíneo de perros.

Las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 de *N. caninum*, previamente cuantificadas fueron proporcionadas por el Dr. Antonio J. Vallecillo, del Laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca.



3.4.3 Materiales químicos

Soluciones para la sensibilización de las placas, consiste en Buffer de carbonatos (100 mM de Na_2CO_3 (Merck, No. cat.: 106393); 100 mM de NaHCO_3 (Merck, No. cat.: 144558), pH 9.6) con 0.1 μg de la proteína NcSAG4 o 0.2 μg de la NcGRA7

Solución buferada de fosfatos (PBS), pH 7.4, (137mM de NaCl (Sigma, No. cat S3014); 2.7 mM KCl (Sigma, No. cat 746436); 10 mM NaH_2PO_4 (Fisher, No. cat S369-1); 1.8 mM KH_2PO_4 (Sigma, No. cat.: P0662), pH 7.4)

Solución para el lavado de las placas (PBS-T0.05) (PBS, pH 7.4 y 0.05% de Tween 20 (Sigma, No. cat.: P1379))

Solución para el bloqueo de las placas y dilución de los sueros (PBS-T0.05-BSA3) (PBS-T0.05; 3% de BSA (Albúmina sérica bovina) fracción V (Roche, No. cat 10735078001))

Solución para la detección de anticuerpos (PBS-T0.05-BSA3; 1:2000 de Proteína A-HRP-(Horseradish peroxidase) (MPI, No. cat.: 55901)

Solución del sustrato para la peroxidasa (Solución de ABTS) (70 mM de Buffer Citrato-fosfato (Sigma, No. cat.: 791725), pH 4.2; 5,48 mg/ml de ABTS (Sigma, No. cat A1888) y 1:10,000 (v/v) de una solución de H_2O_2 al 30% (Fisher, No. cat H325-4)

3.4.4 Procedimiento

Paso 1.- Para el ensayo de ELISA se procedió a la sensibilización de las placas, para lo cual se colocaron 50 μl de la Solución de sensibilización de cada una de las proteínas recombinantes por cada pocillo. Las placas se incubaron en estático durante toda la noche (14 h) a una temperatura de 4 °C (Refrigeración).

Paso 2.- Una vez concluida la sensibilización de las placas con los antígenos correspondientes (NcGRA7 y NcSAG4), se procedió al bloqueo de las placas retirando la Solución de sensibilización y colocando en su lugar 100 μl de la Solución de bloqueo, y se mantuvieron las placas en incubación por 2 h a una temperatura de 23 a 25 °C (Ambiente) en estático.

Paso 3.- Luego de realizados la sensibilización y bloqueo de las placas, se situaron cada una de las muestras de suero diluido 1:10 en la Solución de bloqueo, por duplicado (50 μl) previo lavado de las placas con la Solución de lavado (3 veces durante 5 min, en agitación a temperatura ambiente).



Paso 4.- Las placas con las muestras de suero se incubaron por 1 h, en agitación constante a temperatura ambiente. Concluida la incubación se realizó 3 lavados, de 5 min con la Solución de lavado.

Paso 5.- Posterior a los lavados, se adicionaron 50 µl de la Solución con la Proteína A-HRP, y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente en agitación constante.

Paso 6.- Una vez finalizada la incubación con la Solución de proteína A-HRP, se realizaron 3 lavados, de 5 min con la Solución de lavado.

Paso 7.- A continuación, se realizó la adición de 50 µl de la Solución del sustrato, y se incubó por 15 min a temperatura ambiente, en estático y protegida de la luz.

Paso 8.- Se procedió a realizar la lectura en el lector de placas de ELISA (Epoch Biotech Microplate Reader) a una longitud de onda de 420 nm.

Paso 9.- Como reacción positiva a la presencia de anticuerpos en contra de las proteínas recombinantes se consideraron a las lecturas mayores al promedio más dos desviaciones estándar de las lecturas de las muestras de los sueros sanguíneos de la especie canina.

3.5 Ensayo de Western Blot

3.5.1 Materiales físicos

Cámara de electroforesis para SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

Cámara de electroforesis para la transferencia de las proteínas

Fuente de poder

Micropipetas de diferentes volúmenes y sus puntas

Recipientes de vidrio para la preparación de soluciones.

Potenciómetro (pHmetro)

Balanza analítica

Agitador orbital

Escáner EPSON L380

Computadora

3.5.2 Materiales biológicos

Proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4, previamente cuantificadas.

Muestras de suero sanguíneo de perros.



3.5.3 Materiales químicos

3.5.3.1 Para la resolución de las proteínas mediante SDS-PAGE

Agua destilada estéril

Solución resolving buffer 4X (1,500 mM de Tris-HCl, pH 8.8 (Sigma, No. cat.: T4661, Fisher, No. cat.: 7647-01-0), 0.4% de SDS (Sigma, No. cat 71725)

Solución stacking buffer 4X (1,500 mM de Tris-HCl, pH 8.8 (Sigma, No. cat.: T4661, Fisher, Cat. nó.: 7647-01-0), 0.4 % de SDS (Sigma, No. cat.: 71725)

Solución de acrilamida/bis-acrilamida 29:1 al 30 % (Bio-Rad, No. cat.: 161015)

Solución al 10% de Persulfato de amonio (0.1 g/ml de Persulfato de amonio (Sigma, No. cat.: A3678)

Solución TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diamina (Bio-Rad, No. cat 161-08.01)

Solución buffer para SDS-PAGE (25 mM de Tris base; 1% de SDS; 191 mM de Glicina (Sigma, No. cat.: T4661, 71725; Bio-Rad, No. cat.: 161-0718)

Solución boadding buffer para proteínas 2X (125 mM de Tris-HCl, pH 8.8; 4 % de SDS; 5 % de β -Mercaptoetanol; 20 % de Glicerol; 0.0025 % de Azul de bromofenol (Sigma, No. cat.: T4661, 71725, 63689, G5516, B8026))

Marcador de peso molecular para proteínas (SDS-PAGE molecular weight standards-Low range (Bio-Rad, Cat. no.: 161-0304))

3.5.3.2 Para la electrotransferencia de las proteínas a la membrana PVDF

Solución buffer de transferencia 10X (250 mM de Tris base; 1.91 M de Glicina (Sigma, No. cat T4661, Bio-Rad, No. cat.161-0718)

Membranas PVDF (Thermo scientific, No. cat.: 88520)

Alcohol etílico (Sigma, No. cat.: E7023)

3.5.3.3 Para la tinción de las proteínas transferidas a la membrana PVDF

Solución para la tinción de las membranas de PVDF con azul de Coomassie (1 % de Azul de Coomassie R-250, 10% de Metanol, 7 % de Ácido acético glacial (Bio-Rad, No. cat.: 1610400, Sigma, No. cat.: E7023, Fisher, No. cat 64-19-7))

Solución para desteñir las membranas teñidas con azul de Coomassie (10% de Metanol; 10% de Ácido acético glacial (Sigma, No. cat.: E7023, Fisher, No. cat.: 64-19-7))

3.5.3.4 Para la inmunodetección de los anticuerpos

Solución para el bloqueo de las membranas (PBS-T0.05-BSA3) (10 mM de NaH_2PO_4 ; 1.8 mM de KH_2PO_4 ; 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl; 0.05% de Tween 20, 3% de BSA



fracción V, pH 7.4 (Fisher, No. cat S369-1, Sigma, No. cat P0662, S3014, 746436, P1379, Roche, Cat. no.: 10735078001)

Solución para la dilución de los sueros sanguíneos (PBS-T0.05-BSA3)

Solución para el lavado de las membranas (PBS-T0.05) (10 mM de NaH_2PO_4 ; 1.8 mM de KH_2PO_4 ; 137 mM de NaCl , 2.7 mM de KCl ; 0.05% de Tween 20, pH 7.4 (Fisher, No. cat S369-1, Sigma, No. cat P0662, S3014, 746436, P1379)

Solución para la detección de anticuerpos (PBS-T0.05-BSA3; 1:2000 de Proteína A-HRP-(Horseradish peroxidase) (MPI, No. cat.: 55901)

Solución del sustrato para la peroxidasa (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) en PBS-T0.05 (Sigma, No. cat D5637) y 1:10,000 (v/v) de una solución de H_2O_2 al 30% (Fisher, No. cat H325-4)

3.5.4 Procedimiento

Para el ensayo Western blot se requirió resolver las proteínas recombinantes mediante SDS-PAGE, su posterior electrotransferencia a las membranas de PVDF y finalmente la detección del posible reconocimiento de los anticuerpos presentes en las muestra de suero hacia las proteínas recombinantes. Debido a la diferencia en el peso molecular estimado de las proteínas recombinantes (NcGRA7 33 kDa, y NcSAG4 19.5 kDa), fue posible resolver ambas proteínas por separado en diferentes geles para posteriormente transferirlas a sus respectivas membranas de PVDF.

3.5.4.1 Para resolución de las proteínas recombinantes mediante SDS-PAGE

Paso 1.- Para resolver ambas proteínas se preparó un gel discontinuo desnaturizante de poliacrilamida al 12 %, para el gel resolutivo (Resolving) se colocaron en un recipiente limpio (Tubo Falcon de 50 ml) los siguientes reactivos, previo al armado de las placas con los aditamentos para formar el gel (Gel casting system):

Reactivo:	Número de geles (Volumen del reactivo):	
	Un gel (ml)	Dos geles (ml)
Agua destilada estéril	2.625	5.250
Solución resolving buffer 4X	1.875	3.750
Solución de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 30%	3.000	6.000
Solución al 10% de Persulfato de amonio	0.025	0.050
Solución TEMED	0.002	0.005
Volumen total	7.027	15.055



Paso 2.- Se mezclaron cuidadosamente los reactivos, evitando en lo posible la formación de espuma y de la misma manera se transfirieron a los moldes de los geles, hasta la marca previamente colocada para definir la longitud del gel. Se adicionó un poco de agua destilada estéril para evitar la evaporación del agua del gel y el ingreso de Oxígeno, y se esperó el tiempo suficiente para permitir la polimerización del gel.

Paso 3.- Una vez polimerizado el gel resolutivo se procedió a la preparación del gel concentrador (Stacking), para lo cual se adicionaron en un recipiente limpio (Tubo Falcon de 50 ml) los siguientes reactivos:

Reactivo:	Número de geles (Volumen del reactivo):	
	Un gel (ml)	Dos geles (ml)
Agua destilada estéril	1.445	2.890
Solución stacking buffer 4X	0.625	1.250
Solución de acrilamida/bis-acrilamida (29:1) al 30%	0.375	0.750
Solución al 10% de Persulfato de amonio	0.050	0.100
Solución TEMED	0.005	0.010
Volumen total	2.500	5.000

Paso 4.- Se mezclaron los reactivos con excepción del TEMED. Se procedió a retirar el agua adicionado al gel resolutivo, se colocaron los peines para formar los pozos en un formato de gel preparativo. Se adicionó al gel concentrador, se mezcló cuidadosamente para evitar la formación de espuma y rápidamente se transfirió a los moldes de los geles. Se adicionó un poco de agua destilada estéril y se esperó el tiempo suficiente para permitir la polimerización del gel.

Paso 5.- Una vez preparados los geles, se colocaron en la cámara de electroforesis, se adicionó la Solución buffer de electroforesis SDS-PAGE.

Paso 6.- Ambas mezclas de cada proteínas (20 µg de NcGRA7 y 20 µg NcSAG4 en diferentes geles) antes de colocadas en el gel fueron diluidas con un volumen (250 µl) igual de la Solución buffer de carga 2X, y sometidas a ebullición por 5 min.

Paso 7.- Se cargó la mezcla de proteínas junto con el Marcador de peso molecular para proteínas.



Paso 8.- Se procedió a la resolución con la aplicación de 60 Voltios hasta que las muestras llegaron al gel separador, posteriormente se incrementó el voltaje a 120 y se aplicó durante el tiempo necesario para que el frente de corrida llegue al borde del gel.

Paso 9.- Una vez resueltas las proteínas mediante SDS-PAGE se procedió a la electrotransferencia.

3.5.4.2 Para electrotransferencia de las proteínas recombinantes resueltas mediante SDS-PAGE

Paso 1.- Una vez resueltas las proteínas mediante SDS-PAGE, se procedió a desarmar la cámara de electroforesis, y se retiraron los moldes de los geles.

Paso 2.- En un recipiente plástico con tapa para evitar la evaporación se colocó Alcohol metílico, y se sumergió en él la porción de membrana de dimensiones similares al gel.

Paso 3.- Se adicionó en la cámara de electrotransferencia la Solución buffer de transferencia frío (± 4 °C) y se colocó el adaptador de las carcasas de los “sandwich” de la transferencia.

Paso 4.- Para el armado de los “sandwich” de la transferencia, se ubicó en un recipiente amplio cantidad suficiente de la Solución buffer de transferencia, se introdujo la porción de la carcasa para el “sandwich” del cátodo (Color negro), las esponjas de relleno y una porción de papel filtro, se colocó cuidadosamente el gel previamente retirado de los moldes de vidrio, inmediatamente se puso la membrana evitando la formación de burbujas entre la membrana de PVDF y el gel, se agregó una porción de papel filtro, las esponjas y finalmente la otra porción de la carcasa (Color rojo). Cuidadosamente se retiró del recipiente y se situó en la cámara de electrotransferencia.

Paso 5.- Para la transferencia se completó el armado de la cámara y se aplicó un voltaje de 60 Voltios por 1 h.

Paso 6.- Una vez concluida la electrotransferencia se desarmó la cámara y se retiró la membrana del “sandwich” y se secó a temperatura ambiente, de haber sido visibles las bandas de las proteínas se marcaron con ayuda de un lápiz.

3.5.4.3 Para la tinción de las proteínas transferidas a la membrana de PVDF con Azul de Coomassie

Paso 1.- Para verificar la resolución de las proteínas y la electrotransferencia de las membranas se seccionó una porción de la membrana de ambos extremos intentando incluir una parte de las bandas de las proteínas resueltas y se tiñó con Azul de Coomassie. El resto de la membrana se fraccionó en tiras no mayores a 2 mm de grosor y se almacenaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz y el polvo.



Paso 8.- Para la tinción de las porciones de las membranas, éstas fueron sumergidas por 20 a 40 s en la Solución colorante para la tinción de azul de Coomassie, agitándolas para favorecer el contacto con el colorante.

Paso 9.- Inmediatamente se retiró la Solución colorante para la tinción de azul de Coomassie con las bandas teñidas del Marcador de peso de las proteínas NcGRA7 y NcSAG4 por separado. A las porciones de las membranas restantes se les adicionó cantidad suficiente de la Solución para desteñir. Finalmente se secaron las membranas y fueron guardadas para su posterior uso.

3.5.4.4 Para detección del reconocimiento de las proteínas recombinantes por los anticuerpos de los perros

Paso 1.- Para la detección del reconocimiento de los anticuerpos de los perros hacia las proteínas recombinantes se procedió a realizar el bloqueo de las membranas, para lo cual fueron sumergidas en la Solución de bloqueo durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente (± 23 °C).

Paso 2.- Durante el periodo de bloqueo de las membranas se procedió a descongelar las muestras de suero sanguíneo, éstas fueron diluidas 1:50 en 1 ml de la Solución para dilución de los sueros sanguíneos, en tubos de vidrio de tamaño suficiente para colocar las porciones de las membranas (Tiras de no más 2 mm de grosor) con las proteínas recombinantes.

Paso 3.- Una vez concluido el período de bloqueo de las membranas, a cada tubo con la muestra de suero diluido se le añadió una porción de la membrana. Los tubos así preparados se incubaron por 1 h en agitación constante.

Paso 4.- Concluida la incubación, se retiró la Solución de los sueros diluidos de cada tubo y se llevaron a cabo 3 lavados con 1 ml de la Solución de lavado, por 5 min cada lavado en agitación constante.

Paso 5.- Luego, las tiras fueron transferidas a un recipiente con cantidad suficiente de la Solución con la Proteína A-HRP, se incubaron en agitación constante a temperatura ambiente por 1 h. Una vez concluida la incubación se realizaron 3 lavados con cantidad suficiente de la Solución de lavado, por 5 min cada lavado en agitación constante.

Paso 6.- Finalizados los lavados, en un recipiente se colocó la Solución con el sustrato, cuidadosamente se colocaron las membranas y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 horas.

Paso 7.- Posteriormente, las membranas fueron lavadas dos veces por 5 min en agua destilada estéril.



Paso 8.- Las membranas se secaron a temperatura ambiente, fueron ordenadas y fijadas a un soporte de papel (Cartulina) con pegamento y fueron documentadas con ayuda del escáner EPSON L380.

Paso 9.- Las imágenes fueron analizadas mediante el software libre ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) para evaluar la intensidad de la señal obtenida en los ensayos Western blot.

Paso 10.- Como reconocimiento positivo a la presencia de anticuerpos se consideró a las muestras para las que se obtuvo un valor de la intensidad de la señal mayor al valor de la intensidad de la señal de las réplicas de los blancos (Western blot sin la presencia de suero sanguíneo) más dos desviaciones estándar.

3.6 Análisis estadístico

Para mostrar los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA y Western blot para identificar el reconocimiento de las proteínas NcGRA7 y NcSAG4 de *N. caninum* por anticuerpos generados en los perros potencialmente expuestos a éste parásito, se realizó una estadística descriptiva adecuada a los tipos de variables implicadas para evidenciar el comportamiento de los datos generados.

Se realizó una comparación de las proporciones de muestras de suero con presencia de anticuerpos definidas en los ensayos de ELISA y Western blot con cada una de las dos proteínas recombinantes de *N. caninum* (4 grupos), en dicha comparación está implicada una variable nominal dicotómica y el uso de muestras no independientes por lo que se empleó la prueba Q de Cochran. Además se calculó el intervalo de confianza de las proporciones de muestras de suero con presencia de anticuerpos para *N.caninum*.



CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Ubicación geográfica mediante coordenadas de las muestras tomadas

Se tomaron 100 muestras sanguíneas de perros que se encuentran en contacto directo con bovinos o restos de los mismos ubicados en parroquias aledañas a la ciudad de Cuenca, tales como: Baños, Sinincay, El Valle, Quingeo, Tarqui, Victoria del Portete, Chiquintad, Santa Ana; y cercanas al camal municipal de Cuenca-Azuay. No se distinguió raza, edad o sexo.

4.2 Recolección y transporte de muestras sanguíneas y obtención de los sueros

Se recolectó 2 ml de sangre de cada perro en tubos sin anticoagulante. Se esperó la formación del coágulo y liberación del suero sanguíneo, para luego ser transportados en un cooler con gel refrigerante al laboratorio de Biología Molecular de la F.CC.AA. de la Universidad de Cuenca. Posteriormente se conservaron en refrigeración (± 4 °C) por un periodo máximo de una semana.

Para la obtención del suero se procedió a retirar y desechar el coágulo y se tomó de cada tubo ± 500 μ l suero sanguíneo. A continuación las muestras de suero sanguíneo fueron centrifugadas a $4,500 \times g$, por 10 min a temperatura ambiente (± 23 °C). Por último, se tomó ± 400 μ l de cada muestra de suero sanguíneo y se mantuvieron en congelación (-80 °C) hasta su uso en los ensayos de ELISA y Western blot.

4.3 Ensayo de ELISA

Inicialmente se procedió a la sensibilización de las placas, colocando cada una de las proteínas recombinantes (NcGRA7 y NcSAG4) en cada pocillo. Luego, se procedió al bloqueo de las placas y se mantuvieron en incubación por 2 h. Posteriormente, se situaron cada una de las muestras de suero diluido 1:10 en la Solución de bloqueo, por duplicado (50 μ l) previo lavado de las placas. Se adicionó la Solución con la Proteína A-HRP. Una vez finalizada la incubación con la Solución de proteína A-HRP se adicionó la Solución del sustrato. Finalmente, se procedió a realizar la lectura en el lector de placas de ELISA.

Como reacción positiva a la presencia de anticuerpos en contra de las proteínas recombinantes se consideraron a las lecturas mayores al promedio más dos desviaciones estándar de las lecturas de las muestras de los sueros sanguíneos de perros (**Figura 4**). Para la proteína recombinante NcGRA7 y NcSAG4 se tomaron como

reacciones positivas a la presencia de anticuerpos un valor superior a 0,06 y 0,005 respectivamente.

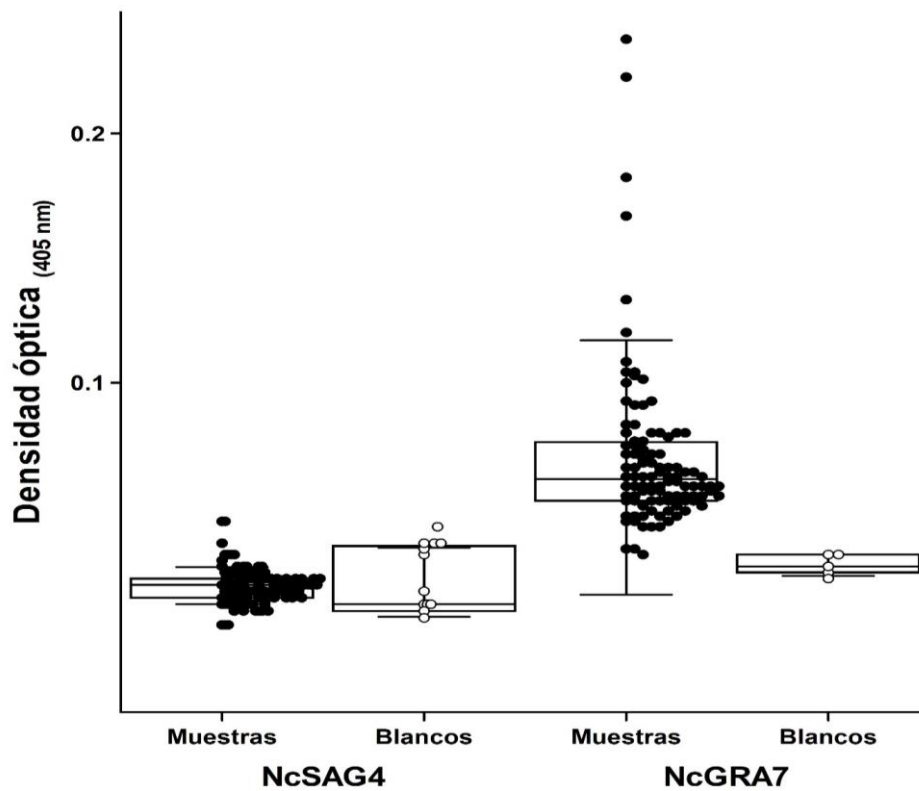


Figura 4. Resultados obtenidos de la aplicación del ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos de *N. caninum* empleando las proteínas recombinantes NcSAG4 y NcGRA7 en 100 muestras de suero sanguíneo de perros.

De los 100 sueros sanguíneos analizados mediante el ensayo de ELISA utilizando la proteína recombinante NcSAG4 no se hallaron perros con densidades ópticas altas que pudieran considerarse como positivos a la presencia de anticuerpos. Sin embargo, al emplear la proteína NcGRA7, se encontraron 4 muestras de animales con presencia de anticuerpos frente a este antígeno. Los perros correspondieron a las muestras sanguíneas tomadas de las parroquias de Santa Ana, Quingeo, Victoria del Portete y Chiquintad.

4.4 Ensayo de Western Blot

Luego de resolver las proteínas recombinantes mediante SDS-PAGE y efectuar la electrotransferencia a las membranas de PVDF, se procedió a la detección del posible reconocimiento de los anticuerpos presentes en las muestras de suero hacia las proteínas recombinantes, para lo cual primero se descongelaron las muestras de suero sanguíneo previo su dilución 1:50 en Solución para dilución, al mismo tiempo que se colocaron en tubos de vidrio las membranas con Solución de bloqueo.

Una vez concluido el período de bloqueo de las membranas, a cada tubo con las membranas se le agregó la muestra de suero diluido y se dejó en incubación para sus posteriores lavados. Luego, las tiras fueron transferidas a un recipiente con la Solución con la Proteína A-HRP, se incubaron y nuevamente se realizaron los lavados. Finalizados los lavados, en un recipiente se colocaron las membranas con el sustrato y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 horas.

A continuación, las membranas fueron lavadas con agua destilada, se secaron a temperatura ambiente, se ordenaron y se fijaron a un soporte de papel (**Figura 5**) para luego ser documentadas y analizadas mediante el software libre ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) para evaluar la intensidad de la señal (en pixeles) obtenida en los ensayos Western blot.



Figura 5. Reconocimiento de la proteína recombinante NcSAG4 por los anticuerpos de los perros mediante el ensayo de Western blot.

Como reconocimiento positivo a la presencia de anticuerpos se consideró a las muestras para las que se obtuvo un valor de la intensidad de la señal (pixeles) mayor al valor de la intensidad de la señal de las réplicas de los blancos (Western blot sin la presencia de suero sanguíneo) más dos desviaciones estándar (**Figura 6**). Para la proteína recombinante NcGRA7 y NcSAG4 se tomó un valor superior a 107,18 y 172,06, respectivamente.

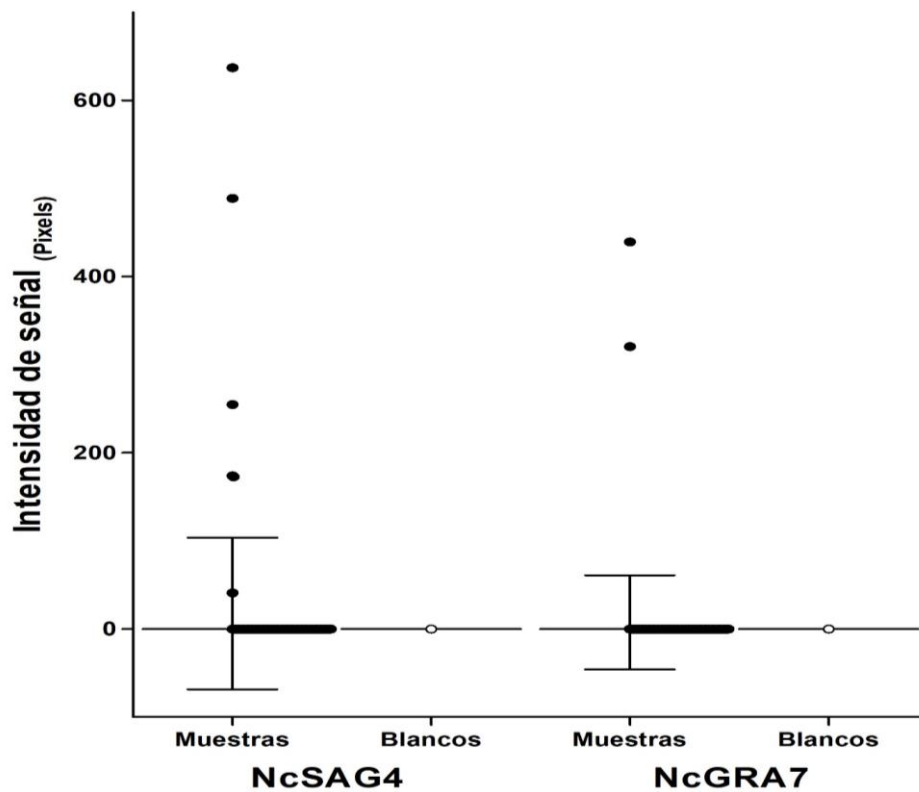


Figura 6. Resultados obtenidos de la aplicación del ensayo de Western blot para la detección de anticuerpos de *N. caninum* empleando las proteínas recombinantes NcSAG4 y NcGRA7 en 100 muestras de suero sanguíneo de perros.

Se obtuvieron 100 muestras de suero sanguíneo de la especie canina, de los cuales se determinaron 3 casos con presencia de anticuerpos para *N. caninum* mediante el ensayo de Western blot usando la proteína recombinante NcSAG4. Estos valores pertenecen a las muestras sanguíneas tomadas de las parroquias de Baños, Sinincay y Chiquintad.

En lo que respecta al Ensayo de Western blot empleando la proteína recombinante NcGRA7 para la posible detección de anticuerpos contra *N. caninum*, se logró observar una intensidad (en pixeles) elevada para 2 de las 100 muestras de sueros sanguíneo analizados, las mismas que están ubicadas en las parroquias de Victoria del Portete y Chiquintad.



4.5 Porcentajes de resultados al aplicar los ensayos de ELISA y Western blot con las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 para la identificación de anticuerpos contra *Neospora Caninum* en sueros sanguíneos de perros.

De acuerdo a la distribución de los resultados obtenidos mediante la utilización de los ensayos de ELISA y Western blot para la detección de anticuerpos frente a *N.caninum* en las 100 muestras de suero sanguíneo de perros localizados en parroquias rurales de la ciudad de Cuenca y en la zona cercana al Camal Municipal de la misma ciudad, los resultados el análisis estadístico con las tablas de contingencia muestras que no es posible rechazar nuestra hipótesis planteada ($p = 0,128$) ,a razón de que ambos ensayos utilizando las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 muestran una capacidad similar para detectar anticuerpos contra *N.caninum*.

Tabla 1. Distribución de los resultados obtenidos con la aplicación de los ensayos de ELISA y Western blot con las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 para la detección de anticuerpos contra *N. caninum* en 100 muestras de suero sanguíneo de perros (Q de Cochran, $p = 0,128$).

Prueba	Proteína	Resultado		Total	Intervalo de confianza*	
		Positivo	Negativo		LI	LS
ELISA	NcGRA7	4 (4,00%)	96 (96,00%)	100	0,23%	8,00%
	NcSAG4	0 (0,00%)	100 (100,00%)	100	0,00%	0,00%
Western blot	NcGRA7	2 (2,00%)	98 (98,00%)	100	0,00%	5,00%
	NcSAG4	3 (3,00%)	97 (97,00%)	100	0,00%	6,00%
TOTAL		9 (2,25%)	391 (97,75%)	400	1,00%	4,00%

*LI y LS= Límite inferior y límite superior para un 95% de confianza.

*Valores de $p \geq 0,05$ no difieren significativamente.

Las 100 muestras de suero sanguíneo de los perros fueron sometidas a 4 ensayos (n = 400) de las cuales se obtuvo un porcentaje total de 2,25% de ensayos con presencia de anticuerpos para el parásito en estudio. Sin embargo, cuando tomamos en cuenta los 100 perros muestreados, se hallaron 6 animales con presencia de anticuerpos contra las proteínas recombinantes de *N.caninum*.



CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Los perros infectados con *N. caninum* representan una de las fuentes de transmisión horizontal de esta parasitosis al encontrarse en contacto con bovinos. Dijkstra *et al.*, (38), valoraron las rutas de transmisión natural de *N. caninum* entre perros de campo y bovinos en un estudio de casos y controles. Los resultados indicaron que la ingestión de placenta, material de los fetos abortados y/o secreciones uterinas en conjunto con excremento en los comederos o lugares de almacenamiento de forrajes fue observada en el 19% de las ganaderías controles y en el 75% de las ganaderías con problemas.

Debido a la transmisión horizontal de la enfermedad es evidente que existan diferencias con respecto al área de origen de los perros como lo indica Escalona *et al.*, (39) los cuales hallaron una alta frecuencia de exposición al parásito en los perros del medio rural, encontrándose que los mismos tienen 4,78 veces más probabilidad de estar infectados que los provenientes de las zonas urbanas. De igual manera, en un estudio realizado para *N. caninum* en la provincia de Pichincha, Cantón Mejía (15) se determinó mediante IFI la exposición al parásito en un 65% en perros ubicados en granjas de producción láctea, esto coincide con los resultados de Oña (22) en el cantón Cayambe. En contraste con lo mencionado anteriormente, para el presente estudio se colectaron muestras sanguíneas de perros localizados en áreas rurales y en contacto con bovinos empleando los ensayos de ELISA y Western blot con dos proteínas recombinantes en donde se obtuvo un porcentaje de 2,25% ensayos positivos que indican la presencia de anticuerpos para *N. caninum*. En 6 animales (65%). El bajo porcentaje encontrado en nuestro estudio podría justificarse debido a que los estudios descritos anteriormente a pesar de que son eficaces presentan cierta reactividad cruzada con otros parásitos lo cual no se ha demostrado cuando se usa proteínas recombinantes como lo afirma Gondim *et al.*, (40).

Estudios realizados en bovinos, como el de Aguado *et al.*, (1) mediante el test de ELISA empleando las proteínas recombinantes NcGRA7 propia de las etapas de bradizoito y taquizoito, y NcSG4 perteneciente a la etapa de bradizoito, han permitido determinar la fase de infección de la enfermedad y su utilidad como medio de inmunodiagnóstico para detectar seroconversión; igualmente Hamidinejat *et al.*, (41) efectuando el mismo ensayo demostró que el uso de la proteína recombinante NcGRA7 es un marcador adecuado y útil para el diagnóstico activo de *N. caninum*. Por tal motivo nuestro estudio con las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 ha permitido únicamente la



detección de perros con presuntas infecciones agudas, al observar mayor densidad óptica para NcGRA7.

Del mismo modo, Hu *et al.*,(42) demostró la presencia de animales infectados con *N. caninum* cuando se usó la proteína recombinante NcSAG4 en Western blot, esto concuerda con nuestro ensayo utilizando NcSAG4 y NcGRA7 en donde se obtuvo una mayor detección de perros con presencia de anticuerpos para este protozoo en comparación con el ensayo de ELISA.

En los resultados de la presente investigación se halló un animal positivo para las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 lo cual nos permitió suponer que este perro se encuentra en etapa crónica con recrudescimiento, mientras que aquellos que sólo reconocieron el antígeno NcGRA7 (n = 3) o NcSAG4 (n =2) son animales presuntivamente en estado agudo o crónico, respectivamente; esto coincide con Romeral *et al.*,(43) cuyo estudio usando el ensayo de ELISA les permitió interpretar los diferentes estadios de la infección en las que se encontraban los perros en estudio, sin embargo no hay evidencias que demuestren efectivamente el curso de la enfermedad y su relación con la presencia de una o ambas proteínas recombinantes como se ha manifestado en bovinos.

Finalmente, nuestros ensayos de ELISA y Western blot no concuerdan con respecto a la detección de anticuerpos contra NcGRA7 y NcSAG4, siendo más notable para ésta última en el ensayo de ELISA, lo cual se podría interpretar basándonos en el estudio realizado en bovinos por Aguado *et al.*, (1) quien expone que esto puede corresponder a animales recientemente infectados con primoinfección que no pudieron reaccionar contra la proteína NcSAG4. Este hallazgo podría ser porque el sistema inmunitario del hospedero apenas estaría expuesto al antígeno. Por lo tanto, puede ser necesario un largo período de tiempo después de la infección primaria para la inducción de niveles significativos de anticuerpos anti-NcSAG4 que puedan ser detectados en el ensayo de ELISA.



CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

Los ensayos de ELISA y Western Blot basados en las proteínas recombinantes NcGRA7 y NcSAG4 permiten identificar perros en cuyas muestras de sueros sanguíneos hay anticuerpos contra de *N. caninum*.

Western blot permitió identificar un mayor número de perros con presencia de anticuerpos comparado con el test de ELISA, sin embargo, ésta diferencia es sólo numérica ya que estadísticamente no fue significativa debido a que las dos proteínas recombinantes utilizadas para los dos ensayos poseen una respuesta similar en el reconocimiento de anticuerpos.

En el ensayo de ELISA para la proteína recombinante NcGRA7 y NcSAG4 se obtuvo un porcentaje de 4% y 0% respectivamente, mientras que en el ensayo de Western blot con NcGRA7 y NcSAG4 los resultados fueron de 2% y 3% correspondientemente para la detección de animales con presencia de anticuerpos contra *N. caninum*.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

Para estudios posteriores se necesita ampliar el número de muestras en donde se incluyan animales positivos y negativos referentes de una prueba diagnóstica validada.

Ajustar los protocolos utilizados para los ensayos de ELISA y Western blot con las proteínas recombinantes bajo condiciones más controladas.



CAPÍTULO VIII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguado A, Álvarez G, Fernández A, Risco V, Arnaiz I, Rebordosa X. Usefulness of rNcGRA7- and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Vet Parasitol.* 2008[citado 10 de Septiembre, 2018]; 157(3-4):182–95. DOI: [10.1016/j.vetpar.2008.08.002](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.002)
2. Álvarez G. Identificación y caracterización de antígenos de “*Neospora caninum*” con interés inmunodiagnóstico en bovinos. Universidad Complutense de Madrid; 2003. Disponible en: eprints.ucm.es/4780/1/T26646.pdf
3. Cuenca JG. Determinación de la prevalencia de Neosporosis bovina e identificación de la presencia de caninos como factor de riesgo en las ganaderías del Cantón Loja. Loja: Universidad Nacional de Loja; 2014. Disponible en: dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/11902/1/JINSOP%20GERARDO%20CUENCA%20FLORES.pdf
4. Dubey J. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean J Parasitol.* 2003[citado 12 de Junio, 2018]; 41(1):1–16. DOI: [10.3347/kjp.2003.41.1.1](https://doi.org/10.3347/kjp.2003.41.1.1)
5. Dubey JP, Schares G. Neosporosis in animals—The last five years. *Vet Parasitology.* 2011[citado 30 Junio, 2018]; 180(1–2):90–108. DOI: [10.1016/j.vetpar.2011.05.031](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.031)
6. Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd.* 1984[citado 12 Junio, 2018]; 70(2):271–4. DOI: [10.1007/BF00942230](https://doi.org/10.1007/BF00942230)
7. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1988[citado 30 Mayo, 2018]; 192(9):1269-85. Disponible en: europepmc.org/article/med/3391851
8. De la Cerda Villar A. Asociación entre la presencia de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en perros con manifestaciones clínicas neurológicas y respiratorias. Aguascalientes: Universidad Autónoma de Aguascalientes; 2015. Disponible en:



[bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/383/402677.pdf?sequence=1
&isAllowed=y](http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/383/402677.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

9. Moore D, Campero C. Neosporosis Bovina: una actualización. Veterinaria Argentina. 2001; 180: 752-775. Disponible en: www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/2757/neosporosis-bovina-una-actualizacion.html
10. Thurmond M, Hietala S, Blanchard P. Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. Vet diagnostic Investig. 1997;9:44–9. DOI: [10.1177/104063879700900108](https://doi.org/10.1177/104063879700900108)
11. Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum*. J Protozoology. 1989;36:458–63. DOI: [10.1111/j.1550-7408.1989.tb01081.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1989.tb01081.x)
12. Lindsay DS, Spencer J, Rupprecht C, Blagburn BL. Use of infected cultured cells to compare ultrastructural features of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii*. Am J Vet Res. 1993;54:103–6.
13. Vonlaufen N, Guetg N, Naguleswaran A, Muller N, Bjorkan C, Shares G. In Vitro induction of *Neospora caninum* bradyzoites in vero cells reveals differential antigen expression, localization and host-cell. Recognition of tachyzoites and bradyzoites. Am Soc Microbiol. 2004;72:576–83. Doi: [10.1128/IAI.72.1.576-583.2004](https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.576-583.2004)
14. Yucaza MG. Determinación de *Neospora caninum* en el Cantón Mejía: Relación canino-bovino. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2015. Disponible en: www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6676/1/T-UCE-0014-026.pdf
15. Speer CA, Dubey JP, McAllister MM, Blixt JA. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol. 1999;29:1509–19. DOI: [10.1016/S0020-7519\(99\)00132-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00132-0)
16. Bjerkas I, Dubey J. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. Acta Vet Scand. 1991;32:407–10.



17. Lindsay DS, Lenz SD, Blagburn BL, Brake DA. Characterization of temperature-sensitive strains of *Neospora caninum* in mice. *J parasitology*. 1999;85:64–7.
18. Ibáñez Y. Situación actual de la respuesta inmune a *Neospora*. Coahuila: Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. División Regional de Ciencia Animal; 2007. Disponible en: repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/42262/1247_YESENIA%20IB%EC%A3%99EZ%20CRUZ.NEOSPORA%20CANINUM.pdf?sequence=1
19. Hemphill A, Fuchs N, Sonda S, Hehl A. The antigenic composition of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*. 1999;29(8):1175–88. DOI: [10.1016/S0020-7519\(99\)00085-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00085-5)
20. Ravelo L. Estudio clínico, serológico y coprológico preliminar de *Neospora caninum* en caninos de la Clínica Veterinaria Dover Bogotá-Colombia. Bogotá: Universidad de la Salle, Facultad de Medicina Veterinaria; 2009. Disponible en: hdl.handle.net/10185/6057
21. Complejo Europeo para el control de los parásitos de los animales de compañía. Control de Protozoos intestinales en perros y gatos. España: ESCCAP; 2013. p. 28. Disponible en: www.esccap.org/uploads/docs/3sbvfy71_ESCCAP_Guide_6_spanish_version_def.pdf
22. Oña WE. Determinación de *Neospora caninum* en el Cantón Cayambe: Relación canino-bovino. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2015. Disponible en: www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6784/1/T-UCE-0014-037.pdf
23. Valenzuela P. Neosporosis en bovinos y caninos. Monografías electrónicas de patología veterinaria. 2005[citado 20 de Octubre, 2018]; 2(1):17–33. Disponible en: www.patologiaveterinaria.cl/Monografias/MEPAVET1-2005/PDF/Mepavet08.pdf
24. Gos L. Evaluación de la presencia de anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* y anti-*Neospora caninum* en sueros caninos de la provincia de Buenos Aires mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y aglutinación directa. Buenos Aires: Universidad de la Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias; 2013. Disponible en:



sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/56164/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=4

25. Duran F. Enfermedades de la reproducción en bovinos. 1ª Ed. Colombia. Grupo Latino Editores. 2009.
26. Silva R, Machado G. Canine neosporosis: perspectives on pathogenesis and management. Dovepress. 2016[citado 21 de agosto, 2018]; 7:59-70. DOI: [10.2147/VMRR.S76969](https://doi.org/10.2147/VMRR.S76969)
27. Barbecho P. Diagnóstico molecular de la infección gastrointestinal de *Neospora caninum* en caninos. Cuenca: Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias; 2017. Disponible en: dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29495/1/TRABAJO%20DE%20TITULACION.pdf
28. Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am J Vet Res. 1989[citado 17 Julio, 2018]; 50(11):1981-1983.
29. Nazir MM, Maqbool A, Akhtar M, Ayaz M, Ahmad AN, Ashraf K, et al. *Neospora caninum* prevalence in dogs raised under different living conditions. Vet Parasitology. 2014[citado 12 de Agosto, 2018]; 204(3-4):364-8. DOI: [10.1016/j.vetpar.2014.05.041](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.041)
30. Goździk K, Wrzesień R, Wielgosz-Ostolska A, Bień J, Kozak-Ljunggren M, Cabaj W. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* in dogs from urban areas in Central Poland. Parasitol Res. 2011[citado 15 de Octubre, 2018] 108(4):991-6. DOI: [10.1007/s00436-010-2143-0](https://doi.org/10.1007/s00436-010-2143-0)
31. Radostits O, Gay C, Blood D, Hinchcliff K. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino. 9ª ed. España: McGraw Hill Interamericana; 2012.
32. Gamón A, Villegas F, Quiroga C. Detección de anticuerpos de *Neospora caninum* en la zona norte de la cuenca lechera del Departamento de Santa Cruz. Santa Cruz: Universidad Autónoma Gabriel René Moreno; 2003. Disponible en: 190.186.110.75/sistemabibliotecario/doc_tesis/GAMON%20A.%20EDUARDO-



[20101119-105009.pdf](#)

33. Silva DAO, Lobato J, Mineo TWP, Mineo JR. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Vet Parasitol.* 2007[citado 23 de Agosto, 2018]; 143(3–4):234–44. DOI: [10.1016/j.vetpar.2006.08.028](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.028)
34. Granillo G, Martínez J. Determinación serológica de *Neospora caninum* en canis domesticus en tres ganaderías lecheras del Departamento de Sonsonate, El Salvador. El Salvador: Universidad de El Salvador; 2008. Disponible en: ri.ues.edu.sv/1593/
35. Schares G, Peters M, Wurm R, Bärwald A, Conraths F. The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. *Vet Parasitol.* 1998[citado 10 de Agosto, 2018]; 80(2):87–98. DOI: [10.1016/S0304-4017\(98\)00195-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00195-2)
36. Jara J, Chávez A, Casas E, Sánchez N, Moreno J, Merza M. Determinación de anticuerpos contra *Neospora caninum* en búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) en la Amazonía peruana. *Rev Inv Vet Perú.* 2011 [citado 19 de Diciembre, 2019];22:61–5. Disponible en: www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172011000100011
37. Potosi G, Roque L. Determinación de la presencia de ooquistes de *Neospora caninum* en materia fecal de perros en 10 hatos lecheros serologicamente positivos a *N.caninum* en el Municipio de Pasto-Nariño. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño; 2015. Disponible en: biblioteca.udenar.edu.co:8085/atenea/biblioteca/91393.pdf
38. Dijkstra T, Barkema H, Eysker M, Hesselink J, Wouda W. Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. *Vet Parasitol.* 2002[citado 7 de Enero, 2020];105(2):99–104. DOI: [10.1016/s0304-4017\(02\)00010-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00010-9)
39. Escalona J, Corro A, Suárez C, Castillo T, Pineda Y. Seropositividad a *Neospora caninum* en perros de áreas rurales y urbanas del Estado Yaracuy, Venezuela. *Rev la Fac Ciencias Vet.* 2013[citado 30 de Enero, 2020]; 29-34. Disponible en: www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-65762013000100004&lang=es



40. Gondim L, Mineo J, Schares G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology*. Cambridge University Press. 2017[citado 30 de Enero, 2020]; 144(7):851–68. DOI: [10.1017/S0031182017000063](https://doi.org/10.1017/S0031182017000063)
41. Hamidinejat H, Seifi Abad Shapouri MR, Namavari MM, Shayan P, Kefayat M. Development of an indirect ELISA using different fragments of recombinant Ncgra7 for detection of *Neospora caninum* infection in cattle and water buffalo. *Iran J Parasitol*. 2015[citado 3 de Febrero, 2020];10(1):69–77.
42. Hu J, Ferroglio E, Trisciuglio A. Immunoblot diagnosis of infection with *Neospora caninum* in cattle based on recombinant NcSAG4 Antigen. *Parasitol Res*. 2011[citado 3 de Febrero, 2020]; 108(4):1055–8. DOI: [10.1007/s00436-011-2286-7](https://doi.org/10.1007/s00436-011-2286-7)
43. Romeral N, Aguado A. Desarrollo de técnicas serológicas para el diagnóstico de la Neosporosis canina. *Rev Complut Ciencias Vet*. 2007[citado 3 de Febrero, 2020]; 108(4);1(2).



CAPÍTULO IX: ANEXOS

Anexo 1. Registro de toma de muestras, coordenadas, edad, sexo y resultados de los ensayos de ELISA y Western blot con las respectivas proteínas recombinantes (NcGRA7 y NcSAG4).

Fecha	Lugar	Coordenadas	N	Edad años	Sexo	ELISA		W.B.	
						NcSAG4	NcGRA7	NcSAG4	NcGRA7
18/02/2019	Baños	2° 55' 13" S 79° 3' 24" O	001	4	H	0	0	0	0
			002	4	M	0	0	0	0
			003	2	M	0	0	0	0
			004	4	H	0	0	0	0
			005	14	M	0	0	1	0
			006	4	M	0	0	0	0
			007	5	M	0	0	0	0
			008	1	H	0	0	0	0
			009	1	M	0	0	0	0
			010	3	M	0	0	0	0
	Sinincay	2° 52' 5" S 79° 0' 15" O	011	1	H	0	0	0	0
			012	2	H	0	0	1	0
			013	3	H	0	0	0	0
			014	1.5	H	0	0	0	0
		2° 52' 5" S 78° 59' 58" O	015	3	M	0	0	0	0
			016	3	H	0	0	0	0
			017	3	M	0	0	0	0
			018	11	M	0	0	0	0
			019	7	H	0	0	0	0
08/03/2019	Santa Ana	2° 56' 24" S 78° 55' 12" O	020	12	M	0	1	0	0
			021	5	H	0	0	0	0
			022	3.5	M	0	0	0	0
			023	3	H	0	0	0	0
			024	15	M	0	0	0	0
19/03/2019	Quingeo	3° 01' 50" S 78° 55' 56" O	025	4	H	0	0	0	0
			026	2	M	0	0	0	0



			027	5	M	0	0	0	0
			028	1.6	H	0	0	0	0
			029	1	M	0	0	0	0
			030	2	H	0	0	0	0

21/03/2019	Quingeo	3° 01' 50" S 78° 55' 56" O	031	2	H	0	0	0	0
			032	3	H	0	1	0	0
			033	8	H	0	0	0	0
			034	1	H	0	0	0	0
			035	0.5	M	0	0	0	0
			036	1	M	0	0	0	0
			037	1.6	M	0	0	0	0
			038	4	M	0	0	0	0
			039	3	H	0	0	0	0
			040	5	M	0	0	0	0
			041	3	H	0	0	0	0
			042	1	H	0	0	0	0
			043	7	M	0	0	0	0
			044	1	M	0	0	0	0
			045	3	M	0	0	0	0
			046	1.6	H	0	0	0	0
			047	5	M	0	0	0	0
048	4	M	0	0	0	0			
049	5	M	0	0	0	0			

25/03/2019	Santa Ana	2° 57' 4" S 78° 55' 56" O	050	9	H	0	0	0	0
			051	5	H	0	0	0	0
			052	0.8	H	0	0	0	0
			053	0.9	H	0	0	0	0
			054	1.5	H	0	0	0	0
			055	3.5	H	0	0	0	0
			056	7	H	0	0	0	0



04/04/2019	Tarqui	2° 59' 7.659" S 79° 4' 55.505" O	057	4	M	0	0	0	0
			058	4	M	0	0	0	0
			059	1	M	0	0	0	0
			060	2	H	0	0	0	0
			061	7	M	0	0	0	0
			062	5	M	0	0	0	0
			063	5	M	0	0	0	0
	Victoria del Portete	2° 59' 11.514" S 79° 4' 51.997" O	064	1.2	M	0	0	0	0
			065	10	M	0	0	0	0
			066	4	M	0	0	0	0
			067	12	M	0	0	0	0
	Victoria del Portete	3° 4' 48.66" S 79° 4' 31.171" O	068	3	M	0	0	0	0
			069	5	M	0	0	0	0
		3° 4' 27.897" S 79° 4' 25.308 O	070	9	M	0	1	0	1

08/04/2019	Chiquintad	2° 48' 38" S 79° 0' 5" O	071	5	M	0	0	0	0
			072	5	M	0	0	0	0
			073	0.8	M	0	0	0	0
			074	10	M	0	0	0	0
			075	10	M	0	0	0	0
			076	7	H	0	1	1	1
			077	0.5	M	0	0	0	0

18/04/2019	El Valle	2° 56' 16.354" S 78°57' 59.389" O	078	2	M	0	0	0	0
	Santa Ana	3° 0' 23.38" S							



		78° 55' 28.35" O	079	2	M	0	0	0	0
	Baños	2° 56' 13" S 79° 2' 46" O	080	2	H	0	0	0	0
			081	4	H	0	0	0	0
	Camal Municipal	2° 51' 52.759 78° 58' 48.925" O	082	7	H	0	0	0	0
			083	6.8	M	0	0	0	0
			084	1.8	M	0	0	0	0
			085	8	H	0	0	0	0
			086	12	H	0	0	0	0
		2° 51' 53.086 " S 78° 58' 57.093" O	087	10	H	0	0	0	0
			088	3	M	0	0	0	0
			089	11	M	0	0	0	0
			090	10	H	0	0	0	0
			091	6	H	0	0	0	0
			092	6	M	0	0	0	0
			Turi	2° 55' 23.988" S 79° 0' 13.579" O	093	1	M	0	0
	094	4			M	0	0	0	0
	095	1			H	0	0	0	0
	096	6			M	0	0	0	0
	097	6			M	0	0	0	0
06/05/2019	Santa Ana	3° 0' 23.38" S 78° 55' 28.35" O	098	1.5	M	0	0	0	0
			099	6	M	0	0	0	0
			100	1.5	M	0	0	0	0

*0 = Muestra negativa a la presencia de anticuerpos.

*1 = Muestra positiva a la presencia de anticuerpos.

*H = Hembra.

*M = Macho.