

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE TEMUCO.
Escuela de Medicina Veterinaria.**



**“PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA EN CADENA DE LA POLIMERASA(PCR)
PARA EL DIAGNOSTICO DE NEOSPORA CANINUM EN TEJIDO NERVIOSO
CENTRAL DE FETOS BOVINOS ABORTADOS”.**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de:
Licenciado en Ciencias Veterinarias.

Andrea Lorena Muñoz Hernández.

Temuco, Chile.
2004

Profesor Guía:

Dr. Ángel Patitucci M.

.....

Informante Interno:

Dra. Maria José Pérez

.....

Informante Externo:

Dra. Ana Gutiérrez M.

.....

Invitado:

Esperanza Parada

.....

Examen de Grado:

26 de Octubre del 2004.

AGRADECIMIENTOS.

Agradecerles a mis Padres y Hermana, por su enorme paciencia, confianza y amor, para lograr este importante paso en mi vida.

A mi profesor Guía Dr. Angel Patitucci, por ser mi Maestro, confiar en mí, ayudar a formar una Profesional en el área de Diagnóstico Veterinario. Y por enseñarme a Creer en mí como Profesional.

A la doctora Maria José Pérez, por enseñarme, que un error es una forma de aprendizaje, que va ha servir para toda la vida.

A la doctora Anita Gutiérrez, por compartir sus conocimientos, y por intentar llegar al final de este camino con éxito.

Al Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, por su enorme apoyo, amistad y cariño, por siempre buscar una gran solución a un pequeño problema.....

A Soledad Siles, SOLEY, por ser una gran amiga, y por su positivismo en los momentos mas difíciles.

A mis amigas Mitzy, Myriam, Esverly, Nivia, Claudia, Susana, Lorena O. Lorena G. , por confiar en mi como amiga, como Profesional y A ti Paula, por ser mi apoyo en este gran proyecto de tesis.

“aprender a saltar una muralla, es complicado, pero no cuando cuentas con un gran Apoyo, GRACIAS A TODOS”

*Dedicado a mis Padres y
Hermana por todo su amor y
paciencia.*

INDICE DE CONTENIDOS.

1.-	Resumen.	1
2.-	Summary.	2
3.-	Introducción.	3
4.-	Revisión Bibliografica.	4
	4.1.- <i>Neospora Caninum</i> .	4
	4.2.- Ciclo De Vida.	6
	4.3.- Estructura.	9
	4.4.- Transmisión.	11
	4.5.- Inmunidad.	13
	4.6.- Neosporosis Bovina.	15
	4.7.- Control Y Prevención.	24
	4.8.- Situación En Chile.	25
5.-	Objetivo General.	26
6.-	Objetivos Específicos.	26
7.-	Materiales Y Métodos.	27
	7.1.- Materiales.	27
	7.2.- Métodos.	30
8.-	Resultados.	40
	8.1.- Clonación Del Control Positivo.	41
	8.2.- Extracción De DNA Desde Sistema Nervioso Central Frescos Y Fijados En Parafina.	44
	8.3.- Técnica De Reacción En Cadena de la Polimerasa (PCR) para Los Sistemas Nerviosos Central Frescos.	46
	8.4.- Puesta A Punto De La Técnica De Reacción en cadena de la Polimerasa (Pcr) Para El Control Positivo.	48
9.-	Discusión.	56
10.-	Conclusiones.	60
11.-	Bibliografía.	62

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1	:	Ciclo de Vida de <i>Neospora Caninum</i>	8
Figura 2	:	PCR del Control Positivo.	40
Figura 3	:	Cuantificación del Plasmado Pgem T Easy + DNA Neospora.	41
Figura 4	:	Clonación Control Positivo.	42
Figura 5	:	Extracción DNA Cerebros Frescos.	44
Figura 6	:	Extracción DNA desde Tejido Fijado en Parafina.	45
Figura 7	:	PCR de Tejido Fresco.	46
Figura 8	:	PCR de Tejido Fijado en Parafina.	47
Figura 9	:	Distintas Concentraciones del Control Positivo.	50
Figura 10	:	Diferentes Temperaturas de Annealing.	51
Figura 11	:	Control Positivo 35 Ciclo.	52
Figura 12	:	Distintas Concentraciones de Cloruro de Magnesio.	53
Figura 13	:	PCR Control Positivo.	55

INDICE DE TABLAS.

Tabla N° 1	:	Hallazgos Histopatológicos.	31
Tabla N° 2	:	Diferentes Concentraciones de Control Positivo.	49
Tabla N° 3	:	Tabla Mezcla Maestra.	54

RESUMEN

Neospora caninum, es un protozoo intracelular, perteneciente al ***Phylum Apicomplexa***, presenta una distribución mundial, teniendo una gran importancia en la producción bovina, pues causa grandes pérdidas económicas, por ser un agente abortigeno.

En Chile ha sido diagnosticada a través de diversas pruebas serológicas, en varias especies, siendo en la VIII; IX y X región, donde se han desarrollado la mayoría de estos estudios.

Con el objetivo de confirmar la presencia de ***Neospora caninum***, en abortos bovinos y establecer los parámetros óptimos para la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa, se analizó un control positivo, cultivo puro del parásito donado por el doctor J: Dubey, y ocho Sistemas Nerviosos Centrales, de fetos bovinos abortados (IX región), sospechosos de ***Neospora caninum***, a los cuales se les realizó la prueba de PCR, presentando resultados negativos a esta técnica.

Después de aplicarle al control positivo, distintas pruebas, para lograr visualizar los factores limitantes en la Reacción en Cadena de la Polimerasa, dio como resultado que la concentración ideal de DNA, para la prueba diagnóstica, es 40ng/μl, la temperatura de annealing de 55°C y la concentración de Cloruro de Magnesio de 1.5mM, siendo estos los parámetros óptimos para la realización de un PCR; para el diagnóstico de ***Neospora caninum***.

SUMARY

Neospora caninum, is protozoo intracellular, pertaining to the Phylum Apicomplexa, presents/displays a world-wide distribution, having a great importance in the bovine production, because it causes great lost economic, being an agent abortigenos.

In Chile it has been diagnosed through diverse serológicas tests, in several species, being in the VIII; IX and X region, where they have been developed most of these studies.

With the objective to confirm the presence of *Neospora caninum*, in bovine abortions and to establish the optimal parameters for the Test of Chain reaction of the Polymerase, I analyze a positive control, pure culture of the parásito donated by doctor J: Central Dubey, and eight Nervous Systems, of aborted bovine fetuses (IX region), suspects of *Neospora caninum*, to which I am made the test to them of PCR, presenting/displaying negative results to this technique.

After applying to the positive control, different tests, to manage to visualize the limitantes factors in the Chain reaction of the Polymerase, gave like result that the ideal concentration of DNA, for the test diagnoses, is 40ng/μl, the temperature of annealing of 55°C and the Magnesium Chloride concentration of 1.5mM, being these the optimal parameters stops to the accomplishment of a PCR; for I diagnose of *Neospora caninum*.

INTRODUCCIÓN

En la producción bovina una de las mayores causas de pérdidas económicas, es el aborto, teniendo varios agentes causales como: Brucelosis, Leptospirosis, Campylobacteriosis, Tricomoniasis, y algunas enfermedades virales como Diarrea Viral Bovina (BVD) y Rinotraqueitis Infecciosa Bovina (IBR).

Sin embargo, nuevos agentes o de reciente reconocimiento, aparecen con el aumento del conocimiento y / o con los cambios evolutivos (*Dubey y col., 1988*). Así en las áreas ganaderas, económicamente importantes del mundo, un grupo de parásitos protozoarios está cobrando importancia como agentes abortigénicos en bovinos (*Anderson y col., 1991; Dubey, 1999, Reichel 2000*).

Los parásitos considerados son ***Neospora caninum*** y ***Sarcocystis spp.*** (*Anderson y col., 1994*) El primero de ellos causa cuantiosas pérdidas en bovinos y su presencia es considerada, la mayor causa de abortos, en lugares donde la brucelosis está controlada (*Anderson y col., 1991*). ***Sarcocystis spp.*** es causante ocasional de brotes y las pérdidas subclínicas no han sido aún evaluadas. Estudios serológicos han revelado que estos organismos tienen distribución mundial (*Dubey, 1993*).

La infección de ***Neospora caninum*** en Chile ha quedado demostrada en varias ocasiones, por la detección de anticuerpos, en bovinos abortados (*Patitucci y col., 1999; Meléndez P. 1999*), en dos rebaños lecheros (*Israel K. Rosas M., 1999*), en población caninas (*Rosas M., 1999*), en equinos (*Carcamo C. 2000*) y en fetos abortados a través de histología e inmunohistoquímica (*Concha O. 2001*).

4.- REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.

4.1.- NEOSPORA CANINUM.

Es un protozoo de localización intracelular, de la subclase *Coccidia* y la familia **Sarcosystidae**. *Bjerkas y colaboradores, 1984*, fueron los primero en reconocer histológicamente una enfermedad neurológica en perros de Noruega, asociado a un parásito similar a **Toxoplasma gondii**, pero no se encontraron anticuerpos contra ***Toxoplasma*** en los perros afectados (*Bjerkas y col., 1984*).

Un parásito con las mismas características, fue identificado en perros de Estados Unidos en 1988 por *J. Dubey*, quien propuso denominarlo ***Neospora caninum*** (*Dubey y col., 1988, 2003*). En estudios retrospectivos se encontró que este parásito causó enfermedad en perros de Estados Unidos en el año 1957 (*Dubey, 1990*).

Existe una gran similitud estructural y antigénica entre ***Neospora caninum*** y ***Toxoplasma gondii***, siendo la primera, una de las mayores causas de abortos en ganado bovino; tanto de carne como de leche (*Anderson y col., 1991; 1995*), mientras ***T. gondii*** no se conoce como un agente abortígeno en ganado bovino, sino como un patógeno de gran importancia en Ovinos y Humanos; aunque *Gottstein y col., 1998*, detecta el DNA de ***T. gondii*** en cuatro fetos bovinos abortados, en Suiza.

Neospora caninum fue identificado en fetos abortados de EEUU y ahora es reconocido, como la mayor causa de aborto, en ganado lechero en California, Nueva Zelanda, Gran Bretaña y otras áreas ganaderas del mundo (*Anderson y col., 1994; 2000; Patitucci y col., 1999a; Dubey, 1999*). Aunque discutido en años anteriores, actualmente se sabe que tanto caninos como bovinos son afectados por la misma especie de parásito (*Ellis y col., 1994, Holdman y col., 1994*).

Barr y col., 1990, 1994; Anderson y col., 1991; 1994; 1997; Conrad 1993, han demostrado, que fetos bovinos abortados por protozoos, comprendieron la categoría más comúnmente diagnosticada, en los laboratorios veterinarios. En la mayoría de esos casos ***Neospora caninum*** fue el microorganismo identificado.

4.2.- CICLO DE VIDA

Hasta los inicios de los años '90, no se tenía mayor información sobre el ciclo de vida de ***Neospora caninum***, *McAllister y colaboradores en 1998*, identifico al perro, como el hospedador definitivo.

Neospora caninum tiene un ciclo similar al de ***Toxoplasma gondii***; existiendo tres etapas infecciosas claramente definidas; Taquizoitos, Quistes tisulares y Ooquistes, las dos primeras etapas, son identificadas, en el hospedador intermedio, mientras, que la última, se encuentra en el hospedador definitivo.

El ciclo, se inicia cuando un hospedador intermedio ingiere un ooquiste esporulado, el que se rompe y liberan los esporozoitos, en el tracto intestinal. Los esporozoitos de ***Neospora caninum*** penetran las células digestivas y se transforman en taquizoitos, los cuales se dividen rápidamente y tienen la capacidad de penetrar y destruir las células (*Dubey J. P. 1999*). Los taquizoitos invaden todo tipo de células incluyendo macrófagos y linfocitos, siendo diseminados por todo el cuerpo del hospedador, pero, no se tiene mayor conocimiento sobre el modelo distribución, de este parásito, en los tejidos (*McAllister y col. 1998; Lindays y col. , 1999*). ***Neospora caninum*** tiene una gran afinidad por tejido nervioso, miocardio e hígado. En esta fase del ciclo los taquizoito se transforman en bradizoitos.

Cuando el hospedador desarrolla una repuesta inmunitaria, los bradizoitos de ***Neospora caninum*** se envuelven por una membrana propia, formando los quistes tisulares, los que pueden estar por varios años en el hospedador, sin causar signos clínicos.

Pueden existir una reactivación de los quistes tisulares, en situaciones donde se comprometa el estado inmunitario del hospedador, como ocurren durante la preñez, llevando a una reconversión de bradizoitos en taquizoitos y subsecuentemente infectando la placenta y al feto. (Innes y col., 2002; Quinn y col., 2002).

Los quistes tisulares se han encontrado en tejido nerviosos, medula espinal y retina de hospedadores intermedios (Lindsay y col., 1993). Recientemente se han reportado quistes, en músculos de bovinos y perros infectados naturalmente por ***Neospora caninum***, pero, estos quistes no han sido encontrados en infecciones experimentales (Peters y col; 2001).

El hospedador definitivo, el perro, aunque no se conoce claramente como se infectan en forma natural, pueden experimentalmente infectarse al comer quistes de un hospedador intermedio, lo que ha sido demostrado al alimentar a estos con cerebros de ratones infectados (Dubey J.P.; 1999), luego de la ingestión de los quistes tisulares, 5 a 17 días, los perros eliminan ooquistes al medio, a través de las heces (Anthony A. y Williamson N.; 2001). En el medio ambiente, luego de tres días estos se vuelven ooquiste infectantes o esporulados, los que contienen dos esporoquistes y cuatro esporozoitos cada uno.

Los ooquistes eliminados por los perros, infectan a los bovinos y otros herbívoros (McAllister y col., 1998), a través de alimentos o aguas contaminadas con heces de caninos infectados y utilizados en la alimentación, reiniciando el ciclo. (Dubey, 1999).

Gondim L. y col., 2004 demostró que también el coyote (***Canis latrans***) es un hospedador definitivo de ***Neospora caninum***, encontrando ooquistes en sus heces. Lo que fue diagnosticado por PCR.

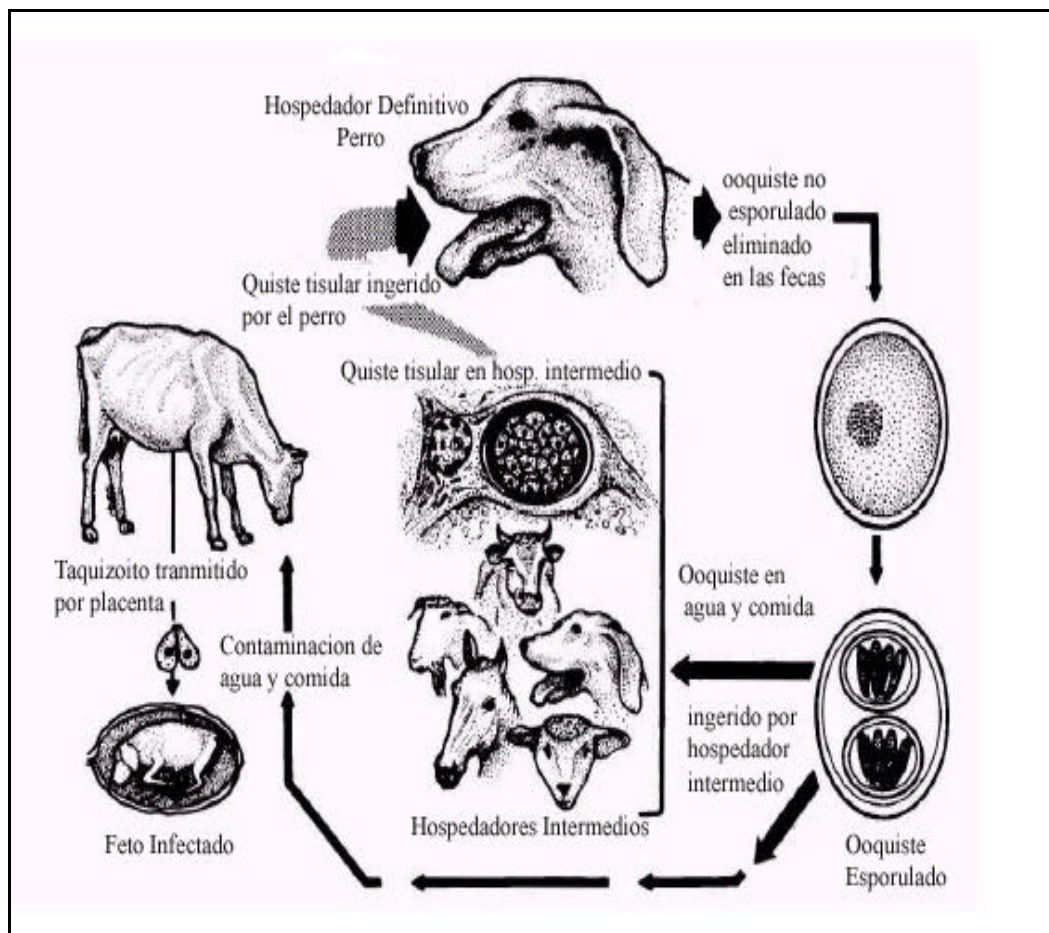


Figura 1. Ciclo de vida de *Neospora caninum* (Dubey 1999).

4.3.- ESTRUCTURA.

4.3.1.- TAQUIZOITOS.

Es uno de los tres estados infecciosos de *Neospora caninum* y se encuentra en el hospedador intermedio y en forma intracelular, generalmente a nivel citoplasmático, específicamente, en la vacuola parasitofaga de la célula hospedador (Dubey J. P., 2003). Puede parasitar a un gran número de células como neuronas, macrófagos, fibroblasto, células endoteliales, miocitos, hepatocitos (Dubey y col., 1988; Dubey y col., 1993; Dubey, 1999). Los taquizoitos se dividen por endodiogénesis en forma rápida. Miden aproximadamente 7,5 ? 2 ?m. de longitud, tienen entre 6-16 roptries y en algunos casos presentaron entre 4-6 roptries localizados posterior al núcleo, raramente se observa un microporo (Speer C. A., 1999).

4.3.2.- BRADIZOITOS.

Los bradizoitos se dividen por endodiogénesis, en forma lenta, encontrándose dentro de los quistes tisulares (Dubey, 2003). Miden aproximadamente 7-8?2 ?m (Dubey; 2003), contiene las mismas organelas que el taquizoito, pero presentan un número menor de roptries (Speer C. A. 1999).

4.3.3.- QUISTES.

Es un estado encontrado en el hospedador intermedio. Los quistes en el tejido son ovalados o redondos y miden hasta 107 μ m de longitud y se encuentran primariamente en el sistema nervioso central, dentro de los estos encontramos los bradizoitos aproximadamente 50 - 500 (Speer C. A., 1999).

4.3.4.- OOQUISTES.

4.3.4.1.-No Esporulados.

Son los eliminados desde perros infectados experimentalmente, midiendo entre 11.7 ? 11.3 μ m en tamaño (Lindsay y col 1999).

4.3.4.2.-Esporulados.

Los ooquistes esporulados, son los que después de tres días en el medio ambiente contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoitos cada uno (Dubey J.P., 1999), son morfológicamente similar a los ooquistes de ***T. Gondii*** y ***Hammondia hammondia***, en fecas de gato y a un parásito similar a ***H. heydorni*** en fecas de perro (Dubey y col 2002).

4.4.- TRANSMISIÓN.

La infección ha sido demostrada que puede ocurrir por tres vías; (*Anthony y Williamson, 2001*).

4.4.1.- INFECCIÓN VÍA ORAL.

A través de la ingestión de quistes tisulares de ***Neospora Caninum***, esto ha sido demostrado en los caninos, pero no, en herbívoros. (*Dubey y col., 1996; Mc Allister y col., 1998; Lindsay y col., 1999*).

También De Marez y col., 1999, demostraron la infección experimental en vacas paridas con ooquistes de ***Neospora caninum***, provocando una moderada respuesta inmune celular y humoral.

4.4.2.- VÍA LACTOGÉNICA.

Fue inducida en recién nacidos dándole calostro, al que se le adhirió taquizoitos de ***Neospora caninum*** (*Uggla y col., 1998*), pero no existe evidencia de que ocurra en forma natural (*Davison y col; 2001*).

4.4.3.- INFECCIÓN POR VÍA TRANSPLACENTARIA.

Ocurre en fetos de bovinos y perros (*Björkman y col., 1996; Paré y col. al., 1996,1997; Anderson y col., 1997*). Es la vía de mayor importancia, demostrada experimentalmente por *Landman en el 2002*, al transferir embriones de madres seronegativas a hembras seropositivas a ***Neospora caninum***, las que parieron neonatos positivos a este protozoo, verificando la transmisión vertical.

Lo que lleva a afirmar que la transmisión vertical, es la mayor forma de infección, siendo más eficiente, en vacas jóvenes, que en vacas adultas (*Dubey J.P.; 2003*).

Anderson y colaboradores en 1997, en un estudio, donde reunió a vacas preñadas seropositivas y vacas Seronegativas a ***Neospora caninum***, posterior al parto se chequearon a los neonatos de cada una de ella, no existiendo en las crías de vacas seronegativas, alguna que presentara anticuerpos contra ***Neospora caninum***, demostraron la no existencia de transmisión horizontal (vaca – vaca).

4.5.- INMUNIDAD.

La resistencia inmunológica, que el animal posee, para responder a una agente externo, varía dependiendo de la especie, el desarrollo o madurez del sistema inmune. (Tizard; 1995).

En los fetos, el sistema inmune se desarrolla aproximadamente a los cuatro meses de gestación. Algunos reportes indican, que la capacidad de producir una respuesta inmune mediada por células en el feto bovino, puede existir en los 120 - 160 días de gestación (Higgins y col., 1983; Hein y col., 1988; Jersen y col., 1988). Estudios realizados por Andrianarivo y col., 2000 en fetos bovinos infectados experimentalmente con **Neospora caninum** a los 159 - 169 días de gestación, evidenciaron el desarrollo de una respuesta humoral a este parásito, detectado por IFA.

La respuesta inmune, que da mayor protección en infecciones causadas por parásitos protozoarios intracelulares, incluyendo a **Toxoplasma gondii**, es la inmunidad mediada por células (Gazzinelle y col., 1993). La resistencia a estos parásitos es asociada con los linfocitos T helper, respuesta inmune tipo I, mediada por citocinas, interferon - γ (IFN- γ), interleukinas 12 (IL-12) y IL-2 (Sharma y col., 1985). El IFN- γ es liberado por los linfocitos T, sensibilizados por lo parásitos intracelulares. Este IFN- γ puede actuar sobre los macrófagos, primero, para hacerlos resistente a los efectos mortales de los parásitos como **Toxoplasma o Neospora**, y segundo, para ayudarlos a eliminar los microorganismos intracelular, ya que permite la fusión de los lisosomas con los fagosomas (Tizard, 1995).

Los quistes, formados por los protozoos intracelulares, como ***Neospora caninum*** parecen ser inmunogénicos y por lo tanto, no estimula la respuesta inflamatoria. Es posible, que este estadio quístico, no sea reconocido como exógeno, sino como parte del feto. (*Tizard, 1995*).

4.6.- NEOSPOROSIS BOVINA

Desde las décadas de los ochenta ha emergido ***Neospora caninum***, como una importante agente causal, de enfermedades reproductivas en el ganado bovino (*Anderson y col., 2000*).

El primer aislamiento asociado a ***Neospora caninum*** fue en 1987, en una finca lechera en Nuevo México. Aunque, estudios retrospectivos en California sugieren que este protozoo ya se encontraba en el año 1985 (*Anderson M; y col, 1999*).

Neospora caninum ha sido diagnosticada, en numerosos países incluyendo: Inglaterra, Escocia, Irlanda, Australia, Nueva Zelanda, Holanda, Japón, Canadá, Francia, Sudáfrica, México, varios estados de EEUU, Argentina, Chile y Brasil, por lo que su distribución es considerada mundial (*Lindsay y Dubey, 1996; Dubey; 1999, Reichel 2000, Patitucci y col., 1999*).

La tasa de abortos es variable y aunque, pueden ocurrir casos con abortos esporádicos, este organismo está generalmente asociado a abortos múltiples. Trabajos realizados, en diferentes regiones ganaderas del mundo reportaron una tasa de abortos a ***Neospora*** entre 20% y un 40% por rebaño afectado (*Anderson y col., 1991; McAllister y col, 1996; Gottstein y col., 1998; Patitucci y col., 1999a*).

Tanto los bovinos productores de carne, como los de leche pueden estar afectados por ***Neospora caninum***, no existiendo, hasta el presente, ninguna predisposición racial (*Dubey, 1999*).

La ***Neospora Caninum***, causa abortos durante todo el año (*Anderson y col., 1991; Thurmond y col., 1995; Wouda Moen, 1998*), existiendo países donde es más común, en verano y otros en invierno. Los abortos pueden ser endémico o epidémicos (*Dubey J. P., 2003b*).

4.6.1.- SIGNOS CLÍNICOS.

El principal signo, en bovinos, es el aborto, la edad promedio, de los fetos abortados es de aproximadamente 5–6 meses, pero, existe evidencia, que las hembras pueden abortar, desde el tercer mes hasta el término de la gestación, (*Anderson y col., 1991; Dubey y Lindsay, 1996, Dubey J. P. 2003*). Existiendo un bajo porcentaje de vacas que repiten aborto por ***Neospora caninum***. (*Anderson y col., 1995*).

Los fetos pueden ser: reabsorbidos, presentarse muertos, momificado, autolizado en el útero, nacido muerto, nacer vivo y presentar signos clínicos, nacer clínicamente normal, pero infectado (*Dubey J. P. 2003a*).

Cuando el neonato presenta los signos clínicos, los que en general se presentan, en animales menores, a dos años, teniendo pesos inferiores a los normales. También puede presentar signos neurológicos, no ser capaz de ponerse de pie, y/o presentar los miembros anteriores y posteriores flectados o hiperextendidos, un examen neurológico, nos puede revelar: ataxia, disminución del reflejo patelar, pérdida de propiocepción conciente, pueden también presentar exoftalmia, asimetría de los ojos. ***Neospora caninum*** en algunos casos pueden presentar hidrocefalia.

También pueden nacer sin presentar los signos de neosporosis, siendo un animal portador de por vida (*Dubey J. P. 2003a*).

4.6.2.- LESIONES.

Las lesiones histológicas características de la infección de ***Neospora caninum***, usualmente es una encefalitis, miocarditis, hepatitis (*Dubey J.P. 2003b.*)

Microscópicamente los tejidos más afectados son: el Sistema Nervioso Central (SNC) y el miocardio; aunque en ciertas ocasiones, los pulmones, el hígado y los riñones, también pueden presentar lesiones. En el cerebro se observan hemorragias multifocales, gliosis multifocal en sustancia gris y blanca, infiltración perivascular de linfocitos y focos de malacia, más comúnmente, en la sustancia blanca. Las lesiones en el SNC tienen una distribución al azar, pero son más fácilmente reconocidas en el tallo del cerebro, debido a que esta región se autoliza menos rápidamente, que el resto del órgano. Las lesiones tempranas consisten en necrosis del tejido nervioso, con o sin hemorragias, las cuales son difíciles de reconocer, en fetos autolizados.

Los corazones afectados presentan, miocarditis y epicarditis difusa con infiltración con células mononucleares, a veces, acompañada de necrosis focal con o sin calcificación (Patitucci, 1994). La hepatitis es más común, en abortos epizooticos que en esporádico (*Woda, Moen y col 1997*).

También pueden estar presentes lesiones en placenta, pero el parásito es difícil de encontrar (*Shivaprasad y col., 1989*). En muy raras ocasiones los taquizoitos de ***Neospora*** pueden ser vistos por el microscopio común sin la ayuda de técnicas inmunohistoquímicas (*Lindsay y Dubey, 1989*).

4.6.3.- DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de *Neospora caninum* puede llevarse a cabo en conjunto con los signos clínicos y pruebas diagnósticas, para hacer un diagnóstico diferencial de: Brucelosis, Campylobacteriosis, virus del IBR y virus DVB.

Hay varias pruebas de laboratorio, las que se describen a continuación:

4.6.3.1.-Examen Parasitológico.

Se examinan las heces caninas infectados donde puede detectar los ooquistes de *Neospora caninum* utilizando, un método de flotación en sacarosa descrito para *Toxoplasma gondii* (Dubey, 1995; McAllister y col., 1998).

4.6.3.2.-Aislamiento.

El primer aislamiento de *Neospora caninum* fue obtenido desde el sistema nervioso central, de un perro infectado (Dubey J. y col; 1988), y posteriormente se reportó en California, el aislamiento, desde un feto bovino abortado.

Después del aislamiento se recomienda las inoculaciones de ratones, ya que aumentan las probabilidades de aislamiento (Yamane, I. y col; 1998) pueden ser utilizadas como técnicas para recobrar *Neospora caninum* de tejidos animales (Dubey y col., 1988).

4.6.3.3.-Microcopia Óptica.

? **Histopatología.**

Esta técnica se usa sobre tejidos bovinos fetales, resulta de gran relevancia como prueba diagnóstica en las infecciones de ***Neospora caninum***. (Helman y col.; 1998). Se describen lesiones, en la corteza cerebral y el cerebelo fetal, que resultaron las regiones más comúnmente afectadas. Existen otros estudios donde revelan, que lesiones histopatológicas de ***Neospora caninum***, se presentaron en el área basal del sistema nervioso central, (Bulbo, protuberancia y pedúnculos cerebrales (Moore D. y col.; 2000).

4.6.3.4.-Pruebas para la Detección de Anticuerpos.

? **Prueba de Inmunofluorecencia indirecta (IFA).**

Empleada en diferentes laboratorios diagnósticos (Conrad y col; 1993; Trees y col.; 1994; Paré y col.; 1995a). Esta técnica fue el primer test serológico usado para demostrar los anticuerpos de ***Neospora caninum***. (Björkman C y col., 1999).

El IFA detecta antígenos de membrana no existiendo reacción cruzada con ***Sarcocystis spp.*** (Dubey J.P y col., 1996). Para diluciones sericas de 1:25 1:640 la sensibilidad y especificidad de la prueba varía de 82.4 a 97 %, 85.7 a 90% respectivamente.

Test de IFA, tiene un buen efecto, en detectar elevados niveles de anticuerpos contra **Neospora caninum**, en el suero en vacas expuestas a infecciones (Conrad y col., 1993). Adicionalmente, la técnica de IFA para Neospora puede ser útil estableciendo el diagnóstico en fetos abortados mayores a cinco meses de gestación, porque poseen un mayor título de anticuerpos (Anderson y col., 1994).

Este test ha sido usado para un gran número de especies animales: como perro, zorro, gato, bovino, ovejas, cabras, equinos, roedores y primates (Björkman C y col., 1999).

? Prueba de ELISA.

El fundamento de una del ELISA es la determinación de anticuerpos contra **Neospora caninum**, en suero, leche u otro fluido (Bjorkman y col., 1994; Paré y col. 1995b; Dubey y col., 1996; Lally y col., 1996; Osawa y col. 1998).

Es un método inmunológico, que permite realizar un gran número de análisis, en un corto tiempo y presenta una alta especificidad y sensibilidad para la detección de infecciones naturales y experimentales por **Neospora Caninum**, (Pare y col., 1995b).

? **Test de aglutinación directa (MAT)** (*Romand y col., 1998*).

Fue descrita en 1959 por *Fulton* para *T. Gondii*, y ha sido el test más usado para este parásito, en humanos y animales. El principio de la aglutinación directa es que los taquizoitos intactos tratados con formalina aglutinan, en presencia de anticuerpos específicos (*Björkman C y col., 1999*). Los anticuerpo tienen la capacidad de aglutinarse, ya que son bivalentes, el test modificado sólo detecta anticuerpos IgG, que sean específicos o no específicos, las IgM son destruidos por 2 -Mercaptoetanol (*Björkman C y col., 1999*). Este test es específico y sensible a ***Neospora caninum*** y no se produce una reacción cruzada con otros parásitos relacionados o no relacionados (*Dubey 1999*).

Esta técnica tiene una gran repetibilidad, es barata, de fácil lectura, utiliza poco equipamiento y material (*Romand S., y col.; 1998*).

Comparándose la técnica de aglutinación e IFA, la sensibilidad y la especificidad que se obtuvo fue 100% vs. 98% y 97% vs. 99% respectivamente (*Packham, A., y col.; 1998*).

Ninguno, de estas técnicas, es útil para el diagnóstico de ***Neospora caninum*** en animales individuales. Sin embargo, en estudios poblacionales, altos niveles de anticuerpos a ***Neospora caninum*** están asociados con aborto en bovinos (*Paré y col.; 1997, Wouda y col.; 1998*).

4.6.3.5.-Pruebas para la detección de Antígenos Parasitarios.

? **Inmunohistoquímica.**

Se realiza sobre tejidos fijados en formalina, con lesiones histopatológicas compatibles con ***Neospora caninum***, presentando una alta especificidad, pero, su sensibilidad es baja, probablemente por los escasos parásitos presentes, en tejidos autolizados. (Anderson M. y col.; 2000).

4.6.3.6.-Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Esta técnica, fue desarrollada, por primera vez por Kary Mullis. En Medicina Veterinaria los primeros informes de esta práctica, datan del año 1989, en trabajos publicados por *Belak, y col 1989; Deacon y Lah en 1989*, en donde se diagnosticaron afecciones virales, en diferentes especies animales, confirmando así las ventajas dadas por Mullis tres años antes. La técnica fue un gran avance para la ciencia, ya que se utilizó, para diagnosticar enfermedades, en las cuales los métodos tradicionales de diagnóstico de laboratorio, eran complejos, engorrosos y caros, como cultivos celulares y microscopía electrónica.

El funcionamiento de esta técnica, imita el fenómeno de replicación de DNA, aislándose el fragmento que debe ser utilizado en un tubo de ensayo, aplicando calor para separar las dos cadenas de la molécula, una vez que se ha enfriado, se añaden fragmentos cortos de ADN denominados Oligos o partidores, que son complementarios a la cadena que se unen, marcando así el segmento que debe ser amplificado. Se añade a la muestra de nucleótidos una enzima denominada ADN polimerasa, la que constituye con los nucleótidos añadidos, una cadena complementaria de cada segmento amplificado, obteniendo de nuevo una molécula

de ADN de doble cadena. Cada ciclo de calentamiento y enfriamiento duplica la cantidad de ADN deseado en el tubo de ensayo, por lo que en unas cuantas horas pueden obtener millones de copias de un fragmento de ADN. Lo anteriormente señalado tiene lugar en tres fases denominadas desnaturalización, templado y polimerización, constituyendo un ciclo completo de PCR que se realiza en menos de dos minutos (*Varraso y col., 2001*).

Como ventajas de esta técnica se puede encontrar: confiabilidad, sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, rapidez, simplicidad y costo (*Rimstad y Evensen, 1993*) y posee la ventaja que puede realizarse a partir de material congelado (*Ellis y col., 1994; Holmdahl y col., 1994*).

4.7.- CONTROL Y PREVENCIÓN.

Si bien no existe un progreso en el control efectivo, algunas de las técnicas que se pueden emplear para reducir la infección en bovinos: eliminando las vacas infectadas, minimización de reemplazos.

Las infecciones congénitas también pueden ser reducidas, sólo reemplazando por hembras seronegativas o realizando transferencia embrionaria (*Thurmond y col., 1995*).

Minimizar la transmisión, desde el hospedador definitivo, para lo cual habría que, disminuir la exposición a tejidos infectados, como placenta, fetos abortados, al hospedador definitivo, el perro. (*Thurmond y col., 1995*).

Reducir la exposición del ganado a los ooquistes, que elimina el hospedador definitivo (*Thurmond y col., 1995*).

Otros factores a tener en cuenta, es la inmunidad de la madre, ante la infección de ***Neospora caninum***, la que juega un papel importante, en la prevención de la infección fetal (*Anderson y col/1994*).

No existen vacunas para prevenir los abortos por ***Neospora caninum*** en el ganado bovino, la neosporosis, es una infección enigmática en bovinos, provocando cuestionamientos sobre los inmunólogos, parasitólogos y veterinarios (*Dubey J. P. 2003b*).

4.8.- SITUACIÓN EN CHILE.

En Chile, recientemente, se ha detectado la infección por ***Neospora caninum*** en vacas que sufrieron abortos (*Patitucci y col., 1999b*). El citado trabajo demostró la presencia del este parásito, en vacas abortadas de tres establecimientos, sobre un total de cuatro, que habían sufrido episodios abortigénicos de causa desconocida. Otro estudio realizado, en dos establecimientos de la IX Región, demostró una prevalencia predial entre 17 y 35% (*Patitucci y col, 2000*). Por otro lado la enfermedad también ha sido reconocida, en perros rurales y urbanos de la IX Región de Chile (*Patitucci y col. 2001*).

Estos datos preliminares, así como, las condiciones epidemiológicas propias, de sistemas de producción extensivos y la elevada cantidad de caninos, asociados a las explotaciones ganaderas, avalan el hecho de que la enfermedad sea importante, en el país.

En el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), los médicos veterinarios y los ganaderos están llevando a cabo, un exitoso plan de control de la Brucelosis Bovina, pero aún, resta trabajo por hacer en el tema de los agentes infecciosos que afectan la reproducción. Por otra parte no se debe descartar su probable potencial patogénico para los seres humanos, ya que, trabajos experimentales han demostrado la infección, en primates no humanos.

Estimaciones monetarias, de las pérdidas ocasionadas por el aborto bovino, son escasas y calcular valores exactos es difícil, debido a los muchos factores que están involucrados (*Olds y col, 1979*). Bajo las condiciones de producción de leche en Chile, donde se posee pariciones durante todo el año, los mayores costos están determinados, por la decisión que se tome con la vaca abortada.

5.- OBJETIVO GENERAL.

- ? Estandarizar la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de ***Neospora caninum*** en Tejido Nervioso Central de fetos bovinos abortados.

6.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- ? Obtener un control positivo de ***Neospora caninum***.
- ? Implementar la técnica de extracción de DNA de cerebro.
- ? Seleccionar los oligos o partidores a utilizar.
- ? Determinar los parámetros óptimos de PCR, para ***Neospora caninum***.

7.- MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1.- MATERIALES.

? Pre – Reacción en Cadena de la Polimerasa. PCR.

? Toma de muestra.

- ? Bolsa estéril.
- ? Termo transporte.
- ? Bisturí.
- ? Pinzas.
- ? Mango de bisturí.

? Extracción de ADN.

- ? Kit de Extracción E. Z. N. A^R tissue ADN Kit.
- ? Agitador.
- ✍ Centrifuga.
- ✍ Baño de agua.
- ✍ Pipetas de 1000ul, 200ul y 20 ul.
- ✍ Tubos eppendorf libres de ADN.

? **Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR.**

- ✍ Termociclador para PCR.
- ✍ Tampón.
- ✍ Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$).
- ✍ dNTPs.
- ✍ Agua destilada, desionizada.
- ✍ Partidores (Yamaga M. y col. 1996).
- ✍ Taq DNA polimerasa.
- ✍ Pipetas de 1000UL, 200ul y 20 ul.
- ✍ Tubos eppendorf para PCR libres de ADN.

✍ ***Post Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR***

? **Electroforesis.**

- ✍ Agarosa 0.8 y 2 % (DNA Grado Fisher Scientific (fisher Chemical)).
- ✍ Tampón TAE.
- ✍ Bromuro de Etidio (100 $\mu g/ml$).
- ✍ Loading buffer (Invitrogen, 6X BlueJuice).
- ✍ Marcador de peso molecular DNA Ladder
(Fermente gene Ruler 1 Kb DNA 0.5 mg DNA / ml).
- ✍ Sistema de electroforesis Bio Rad Power / PAC 3000.
- ✍ Sistema de fotodocumentación Darkroom CN-TFX Vilber Lormat.
- ✍ Programa Computacional Chemilmager 4400
(Alpha Innotech Corporation).
- ✍ Lámina parafilm.
- ✍ Pipeta de 200ul y 20ul.
- ✍ Balanza analítica.

? **Generales.**

- ✍ Refrigerador.
- ✍ Freezer $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ UUT.
- ✍ Guantes.
- ✍ Cajas de polietileno.
- ✍ Congeladores.
- ✍ Puntas.

7.2.- METODOS.

? **Selección de Muestras.**

La selección de las muestras se hizo de forma no probabilística, por conveniencia.

? **Toma de Muestra.**

Se procedió a extraer los cerebros de 8 fetos, que se presentaron como casuística para el área de Patobiología de la Universidad Católica de Temuco. A los que se les realizó una necropsia, donde se procede a abrir el feto, desde la zona abdominal hacia torácica, revisando todos los órganos, uno por uno y tomando muestras de los que se tenga sospecha de una patología, luego los cerebro fueron extraídos, lo más asépticamente posible, rompiendo el cráneo, luego con una hoja de bisturí y se extrajo con una pinza, colocándola en una bolsa plástica estéril, luego se rotuló y se congeló a -70°C , hasta que fuera utilizado para la extracción de DNA. Para tomar la decisión de realizar la extracción se procedió a hacer un examen histopatológico, dando los siguientes resultados.

Feto N°	Histología
1°	Encefalitis, Hepatitis, Miocarditis
2°	Encefalitis, Hepatitis, Miocarditis
3°	Encefalitis, Hepatitis, Miocarditis
4°	Encefalitis, Hepatitis, Miocarditis
5°	Hepatitis Miocarditis
6°	Hepatitis Difusa
7°	Hepatitis Periportal
8°	Neumonía Hepatitis

Tabla N° 1: Hallazgos Histopatológicos.

? **Extracción de ADN desde Sistema Nervioso Central.**

Se ocupó un kit comercial Extracción E. Z. N. A ®¹ tissue ADN , llevándose a cabo, instrucciones de acuerdo a las del fabricante, se añadió a un tubo eppendorf 30 mg de tejido cerebral pulverizado, el cual, previamente fue procesado, en un mortero congelado , al que se le agregó 200 µl de buffer TL. Luego de lo cual, se la añadió 25 µl de Proteinasa K (20 mg/ml), y se mezcló, para colocarlo en un homogenizador a 55 ° C por tres horas. Luego, de la incubación se le añadió 220 µl de Buffer BL y se aplicó vortex, para luego incubarla a 70 ° C por 10 minutos. Posterior a esto se le agregó 220 µl de etanol absoluto y se procedió a aplicar vortex, se extrajo la muestra completa y fue colocada en el sistema de columnas, con un tubo de 2 ml, fue centrifugado a 8.000 x g por un minuto, se eliminó el líquido y la columna fue colocada en otro tubo de 2 ml, a la cual se le añadió 750 µl de buffer de etanol con agua, el que fue mezclado con anterioridad. Se procedió a centrifugar a 8.000 x g por un minuto y se elimina el líquido centrifugado, se coloca nuevamente la columna

¹Laboratorio Omega Biotek.

en otro tubo de 2 ml. y se le agrega 750 μ l de buffer de agua con etanol, se centrifuga a 8.000 x g por un minuto, posterior a esto, el liquido se elimina, se toma la columna y se coloca en otro tubo de 2 ml y se centrifuga en seco a 10.000 x g por dos minutos, este es un paso de gran importancia en la extracción; luego la columna, es colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le añade 200 μ l de buffer elution, la que fue precalentada a 70 ° C con anterioridad, y se deja por tres minutos a temperatura ambiente, se centrifuga a 8.000 x g por un minuto, se tomó la columna y se coloca en otro tubo eppendorf de 1.5 ml agregando 200 μ l de buffer elution se deja a temperatura ambiente por tres minutos y luego es centrifugado a 8.000 x g por un minuto. Los tubos son rotulados y guardados a –20 ° C, hasta su uso.

Para comprobar una buena extracción se procedió a correr un gel de 0.8 % agarosa para ver si estaba degradado.

? **Extracción de ADN desde Tacos fijados en Parafina.**

Se toman cortes de 10 μ m y se procede a raspar con un bisturí estéril , se procede a colocar dentro de un tubo eppendorf de 1.5 ml, al que se agrega 1 ml de Xilol, se hace un vortex para luego centrifugar a 10.000 x g por diez minutos, se elimina el sobrenadante, se le agrega 1 ml de etanol absoluto, se centrifuga a 10.000 x g por cinco minutos y se elimina el sobrenadante, se repite el lavado con etanol nuevamente, el pellet se deja secar por quince minutos a 37 ° C.

Posterior a esto, se procede a seguir con el protocolo de extracción de tejido fresco, anteriormente explicado. Diferenciándose solamente, en el último paso donde se agregan solo 100 μ l de buffer elution.

? **Selección y obtención de nucleótidos.**

Los oligos o partidores elegidos corresponden a los descrito por *Yamage y col.*, 1996., Np 21 (5' < GT GCGTCCAATC CTGTAAC < 3) y Np6 (5' > CAGTCAACCTACGTCTTCT > 3), que amplifican un segmento de 328 pb del gen específico de ***Neospora caninum*** descrito por *Kauffmann y col.*, 1995 (GenBank™ X 84238).

? **Obtención del control.**

El control positivo, corresponde a un DNA de ***Neospora caninum***, el que fue donado por el Doctor J. Dubey desde Estados Unidos, el cual será clonado en el vector pGEM T easy, y como control negativo se utilizó agua destilada.

? **Técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa. PCR.**

Para la amplificación del DNA será procesada en 50 µl de la mezcla, la cual contiene 1 µl de la muestra, 5 µl de solución tampón 5x, 2 µl de cada primer a una concentración de 10 pmol/µl, 4 µl de MgCl₂ a 25 mM, 1 µl de dNTPs a una concentración de 10 mM y 0.3 µl de *Taq* DNA polimerasa a 5 u/µl. Posteriormente esta mezcla fue mantenida en hielo a 4 ° C hasta ser colocada en el termociclador, Perkin Elmer, gene Amp PCR System 2400, con las siguientes condiciones: 60 seg. A 94°C, 60 seg. A 55°C y 210 seg. A 74°C, con un total de 40 ciclos, luego fue mantenida en hielo.

También se probó otra técnica de amplificación donde lo único que se modificó fueron tiempo y temperaturas: 5 minutos de desnaturalización a 95°C., luego se realizaron 40 ciclos con la siguiente secuencia térmica, 60 segundos a 94°C. “desnaturalización”, 60 segundos a 60°C. “annealing”, 90 segundos a 74°C., después del último ciclo se agregó, 600 segundos a 74°C. (Müller N. 1996).

? **Preparación del Gel de Azarosa.**

Se utilizó un gel de agarosa al 2 %, el que contenía 2 gramos de agarosa y 100ml de TAE. Al lo cual se le agregó 1 µl de Bromuro de Etilo.

? **Carga del Gel de Azarosa.**

En la primera celda del gel, se coloca el marcador de peso molecular DNA Ladder (Fermente gene Ruler 1 Kb DNA 0.5 mg DNA / ml.), en las celdas siguientes se coloca 1 µl de cada tubo: control positivo, control negativo y muestras amplificadas, las que se colocaron junto con 1 ul de Loading buffer (fermenta, 6X BlueJuice) y colocadas en un gel de agarosa al 2 % .para realizar la corrida de electroforesis, a 80 volt.

? **Clonación Control Positivo.**

Para realizar la clonación se procede a realizar un PCR del control positivo, siguiendo los pasos recomendados por Yamage y col, 1996; el que será clonado en pGem ® T easy vector sistem 1.(Promega).

En un tubo eppendorf se colocan 5 μ l de buffer 2x, 3 μ l de PCR control positivo, 1 μ l vector pGem T Easy y 1 μ l enzima T4 DNA, esto se deja hasta el día siguiente a 4 °C.

Se coloca en una celda de electroforación y se deja enfriar en hielo por 30 minutos, en la celda se colocan 2 μ l de mi plásmido y 50 μ l de la bacteria (DH5 α) electro competente, a la que se le aplica 1380 V de voltaje dos veces. Luego se resuspende en 200 μ l de SOC, medio de cultivo, se coloca a la mezcla de DNA más la bacteria, es llevado a 37° C, en agitación por 90 minutos. Luego se siembra entre 30 μ l y 70 μ l en placas que tiene medio LB +AB (Ampicilina), y se deja a 37° C toda la noche.

Se seleccionan las colonias a través de, X – gal e ILTG, lo que lleva a formar colonias blancas y azules.

Al otro día se extraen las colonias blancas, las que son colocadas en un tubo falcon (5ml) que tiene LB + AB (ampicilina) y dejarla toda la noche con agitación, para luego realizar una miniprep, E.Z.N.A.™, Plasmid miniprep Kit . Omega Bio – tek. Para la realización de esta se procedió a seguir las instrucciones del proveedor. Obteniéndose 50 μ l de solución.

? **Digestión Clonación Control Positivo.**

Se coloca 1 μ l de nuestra solución obtenida de la miniprep, conjunto con 1 μ l de la enzima *Eco R1*, 1 μ l del buffer de la enzima y 7 μ l de adesi, luego se coloca a 37 ° C. Por una hora.

? **Protocolo de Secuenciación DNA.**

Se utilizó Silver Séquense DNA sequencing reagent. Promega.

1.- Preparar 4 tubos de PCR marcados con (G,A,T,C.) respectivamente agregando a cada tubo 2'l del d/ddntp mix apropiado, colocar los tubos a 4°C hasta que sean utilizados.

2.- Para la secuenciación, mezclar los siguientes reactivos en un tubo eppendorf.

? **Rx Muestra.**

? DNA templado plamidal (2-4 ?g) 1-2 pmol/1?l.

? Buffer secuenciación 5 x5 ?l.

? Primers 4-5 pmol 3.45?l.

? agua destilada libre de nucleasas, 16 ?l.

? **Rx Control.**

? pGEM® 32 f(+)DNA control 4?g.

? Buffer secuenciación 5x.

? Primers pVc/Mb For word. (4,5 pmol)

? Agua destilada libre de nucleasas.

3.- Agregar 1?l de Taq polimerasa , mezclar por pipeteo fuerte.

4.- Agregar 4 ?l del mix enzima/ primer/ templado del paso 3ª a cada tubo del mix d/ddntp y mezclar bien.

- 5.- Mezclar corto en la centrifuga.
- 6.- Colocar los tubos en el termociclador que ha sido precalentado a 95° Celsius.
- 7.- Después de finalizada la amplificación, agregar 3?l de solución Stop de secuencia de DNA, se realiza un spin (centrifugación en corto tiempo) para detener la reacción.
- 8.- Calentar la reacción a 70° C por 2 minutos, inmediatamente antes de cargar 3-5 ?l de cada reacción, en el gel de poliacrilamida 4-6% de secuencia con espaciadores de 0.4mm.

? **Preparación del Gel Acrilamida para Secuenciar.**

- 1.- Para hacer el gel Acril/ urea 70ml, agregar 360?l de Persulfato de amonio 10% mas 36?l de TEMED.
- 2.- Antes de montar el vidrio se debe agregar Bind Silone al vidrio chico.
- 3.- Se limpia la placa de vidrio largo, con un kleenex saturado en Sigmalote (1ml).

- 4.- Se arma la cámara de electroforesis para secuenciación y luego se carga el gel preparado. Se deja por 2 horas hasta que se gelidifique.
- 5.- Se saca la Urea de los pocillos, para lo cual se hace correr el gel a 1.800volt por 30 minutos.
- 6.- Se carga 3-4?l de cada solución y se deja correr a 1.800 volt, cada 2 horas y luego se carga de nuevo y se deja correr a la misma velocidad otras dos horas.

? **Tinción de GEIES de secuenciación con Nitrato de Plata.**

- 1.- Fijar el gel: poner el gel en una bandeja y cubrirlo con la solución Fix /stop agitando por 20 minutos.
- 2.- Lavar el gel: se lava tres veces por 2 minutos cada una con Adesi usando agitación , levantando el gel fuera del lavado permitiendo drenar por 10-20 segundos antes de transferir al siguiente lavado.
- 3.- Teñir el gel: transferir al Nitrato de Plata agitando por 30 minutos, sumergir y sacar.
- 4ª.- Completar la preparación de la solución de revelado, agregando el formaldehído y trisulfato de sodio.

- 4^b.- Remover el gel dejando a un lado , transferir la solución de teñido a una botella y lavar la bandeja con agua.
- 5.- Enjuagar el gel en Adesi no más de un segundo y colocar en la bandeja con el revelador.
- 6.- Agitar la solución hasta que las bandas comiencen a notarse , transferir el gel al resto de la solución de reveladora, continuando 2-3 minutos o hasta que esté todo visible.
- 7.- Para terminar la reacción de desarrollo y fijar el gel, agregar la solución Fix/stop directamente sobre la solución de revelado por 2-3 minutos.
- 8.- Enjuagar por 2 minutos dos veces con adesi.
- 9.- Secar el gel a temperatura ambiente.

Posteriormente se coloca en una fuente de luz y se lee de abajo hacia arriba, teniendo en cuenta la forma de ser cargado.

8.- RESULTADOS.

8.1.- CLONACIÓN DEL CONTROL POSITIVO.

8.1.1.- PCR CONTROL POSITIVO.

Para la realización del PCR, se utilizó la técnica de amplificación recomendada por Yamage y col, 1996.

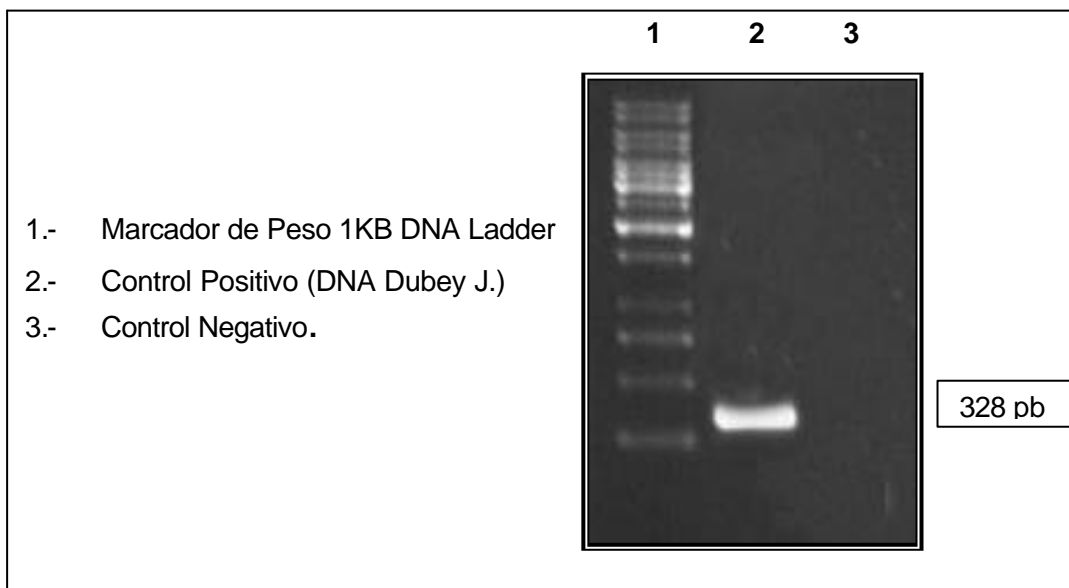


Figura 2: PCR del Control Positivo.

8.1.2.- CUANTIFICACIÓN.

Para la realización de la cuantificación se utilizó un el Plasmido PRB 322, el que tiene una concentración conocida de 50 ng/ μ l, con el cual, a través del Programa computacional Chemilmager 4400 (Alpha Innotech Corporation), se procedió a cuantificar.

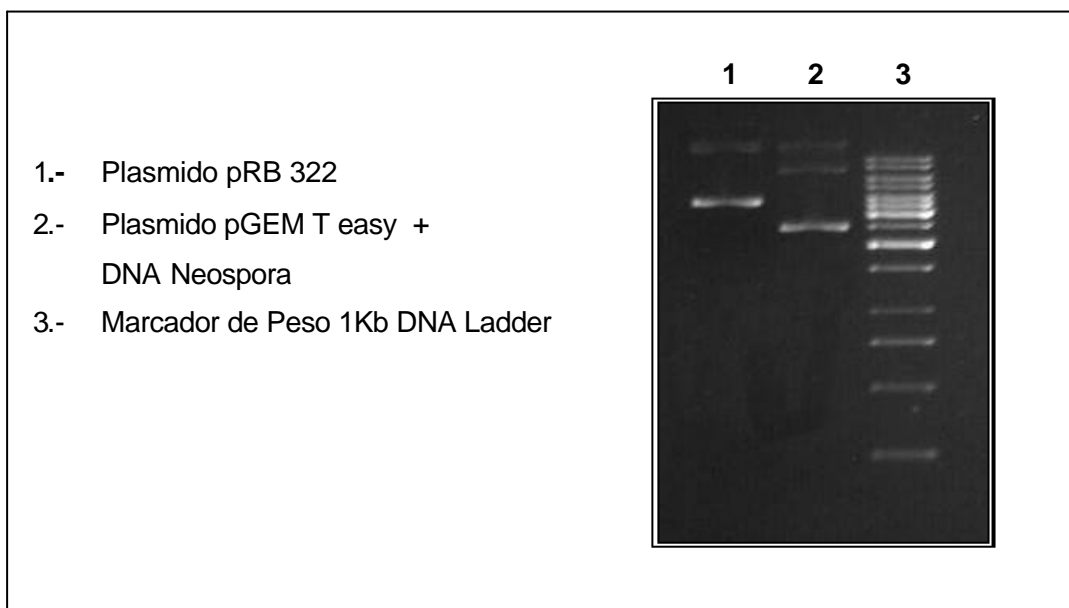


Figura 3: Cuantificación del Plasmado pGEM T easy + DNA Neospora.

8.1.3.- DIGESTIÓN CONTROL POSITIVO.

Se logró la clonación del control positivo, lo que queda demostrado, en la fotografía, la que fue digerida primeramente, con la *enzima Eco R1*. La banda superior corresponde al plasmido pGEM T easy y la segunda banda es el control positivo clonado.

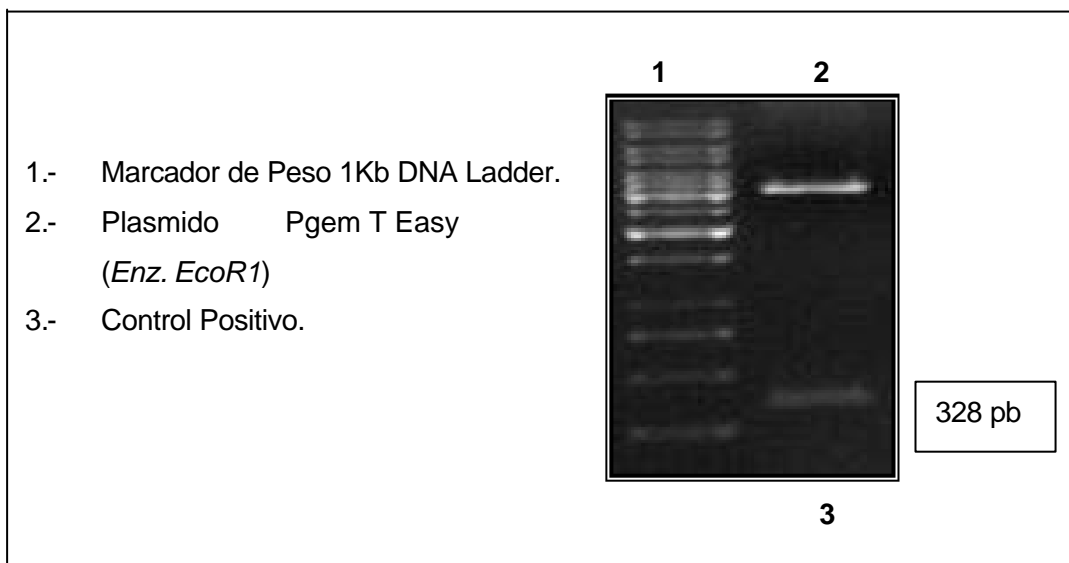


Figura 4 Clonación Control Positivo.

8.1.4.- SECUENCIACIÓN DEL CONTROL POSITIVO DE *NEOSPORA CANINUM*.

La secuenciación, dio como resultado la siguiente secuencia de nucleótidos, luego de procesarla en el programa Blast, la secuencia coincidió en un 97% de homología a *Neospora caninum*, (genbank X 84238)

```
776 CAGTCAACCTACGTCTTCTGCCCCCTCCCCTCGTCCGCTTGCTCCCTATGCATAATCTCCC 717  
      Np6  
716 CCGTCATCAGCGCCCGGTGTTGCCTCAACACAGAACACTGAACTCTCGATAAGTATCA 657  
656 TTGACACACTGTCCACACCCTGACGCAGGCTGATTTCAACGTGACGAATGACTAACCACA 597  
596 AACCACGTATCCCACCTCTCACCGCTACCAGTTCCTCGGTTCACCCGTTACACACTAT 537  
536 AGCCACAAACAAAAAAGGAGCCTTGCTGCCGCATGCTGCGCCCAACAACGACACGTCAGC 478  
477 AGAGCAACACGTTACAGGATTGGACGCAC 447
```

NP21

8.2.- EXTRACCIÓN DE DNA DESDE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL FRESCOS Y FIJADOS EN PARAFINA.

Se lograron hacer varias extracciones de DNA de cerebros frescos, pero ninguno concluyó con un PCR positivo. Con los tejidos fijados en parafina no se logro una extracción exitosa. Para las dos extracciones se utilizo el mismo kit, demostrando la gran diferencia que existe entre los dos tipos de tejido y su calidad de extracción.

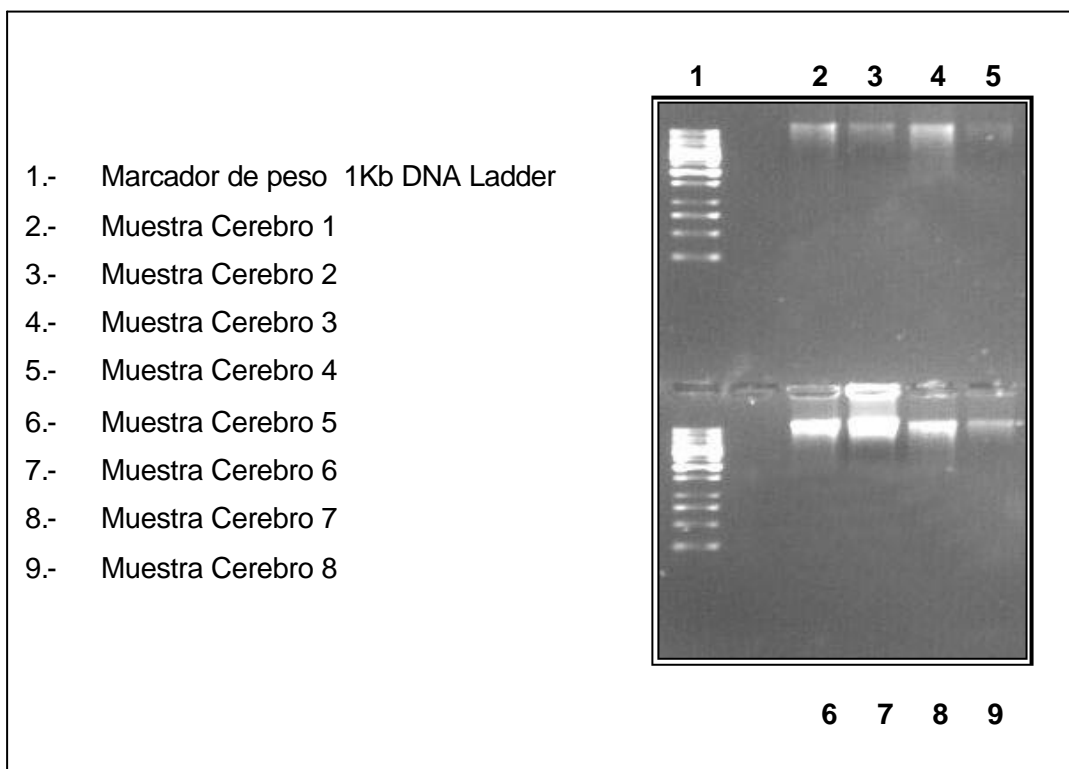


Figura 5: Extracción DNA cerebros frescos.

**8.2.1.- EXTRACCIÓN DE DNA DESDE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL
FIJADOS EN PARAFINA.**

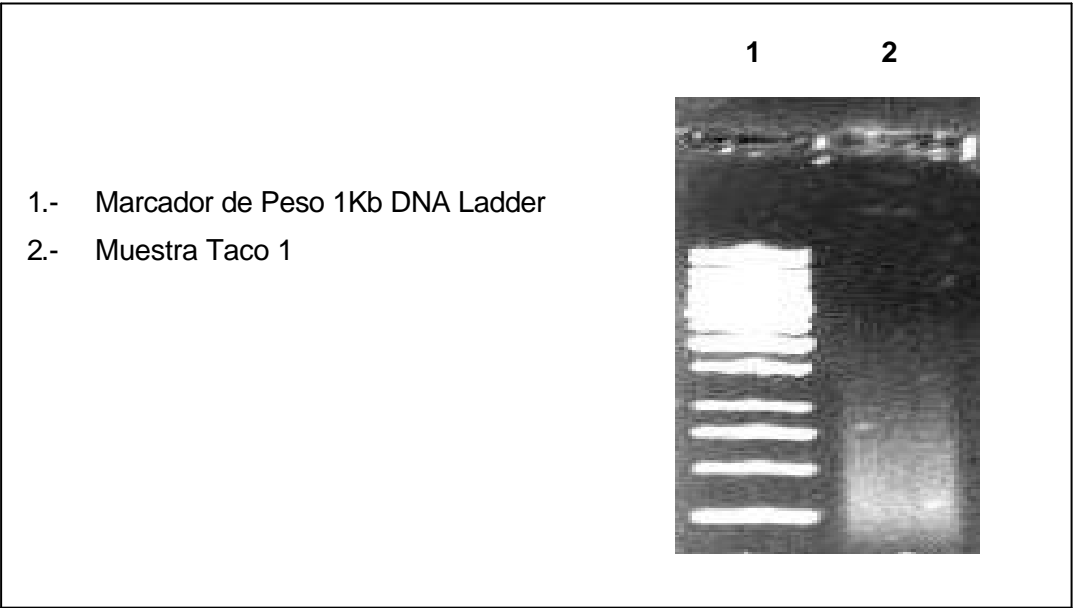


Figura 6: Extracción DNA desde tejido fijado en Parafina

8.3.- TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LOS SISTEMAS NERVIOSOS CENTRAL FRESCOS.

Para la realización de PCR, siguiendo las recomendaciones de *Yamage, 1996*, en las extracciones de Sistema Nervioso Central de fetos bovinos abortados, obteniendo resultados negativos en cada uno de ellos.

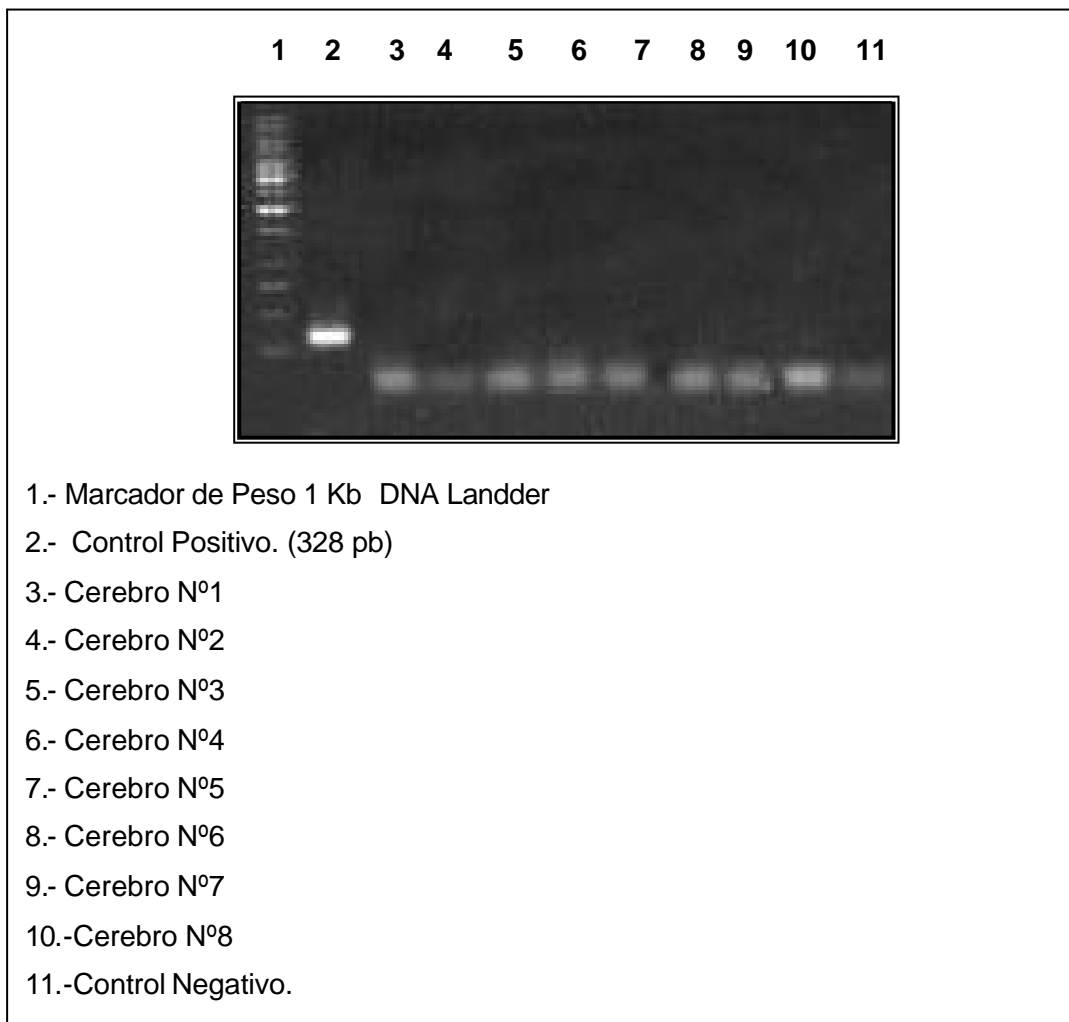


Figura 7: PCR de Tejido Fresco

8.3.1.- TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LOS SISTEMAS NERVIOSOS CENTRAL FIJADOS EN PARAFINA.

Para la realización de PCR, siguiendo las recomendaciones de *Yamage, 1996*, en las extracciones de Sistema Nervioso Central de fetos bovinos abortados fijados en parafina, obteniendo resultados negativos.

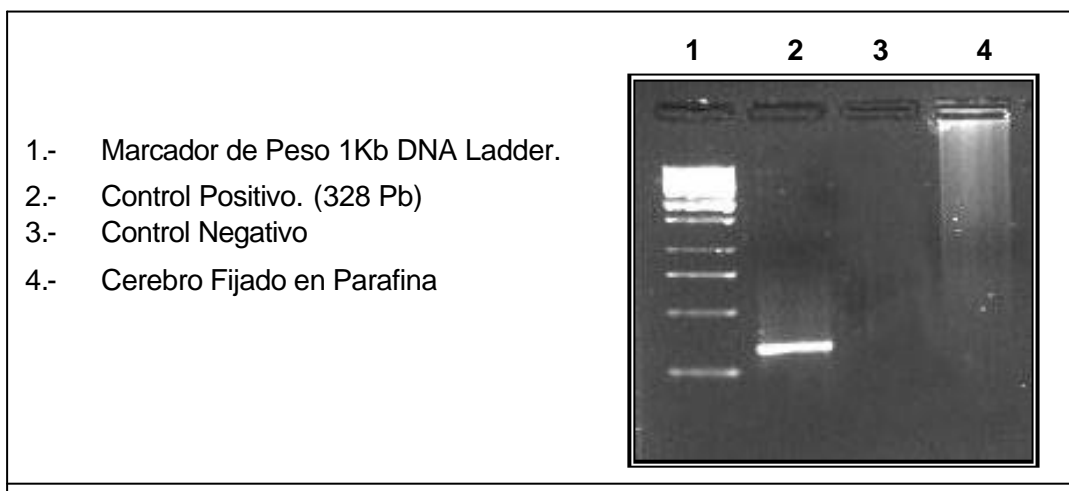


Figura 8: PCR de Tejido Fijado en Parafina

8.4.- PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA DE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL CONTROL POSITIVO.

Para poner a punto la técnica de PCR para el control positivo, se realizaron variaciones como: modificaciones en las cantidades de la mezcla y las variaciones en las temperaturas del termociclador.

8.4.1.- DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL CONTROL POSITIVO.

Se probó diferentes concentraciones del control positivo clonado, dando un buen resultado, en concentraciones de 40.4 ng/μl y 60.6 ng/ μl, lo que equivale a 1μl y 1.5 μl, utilizando las siguientes concentraciones:

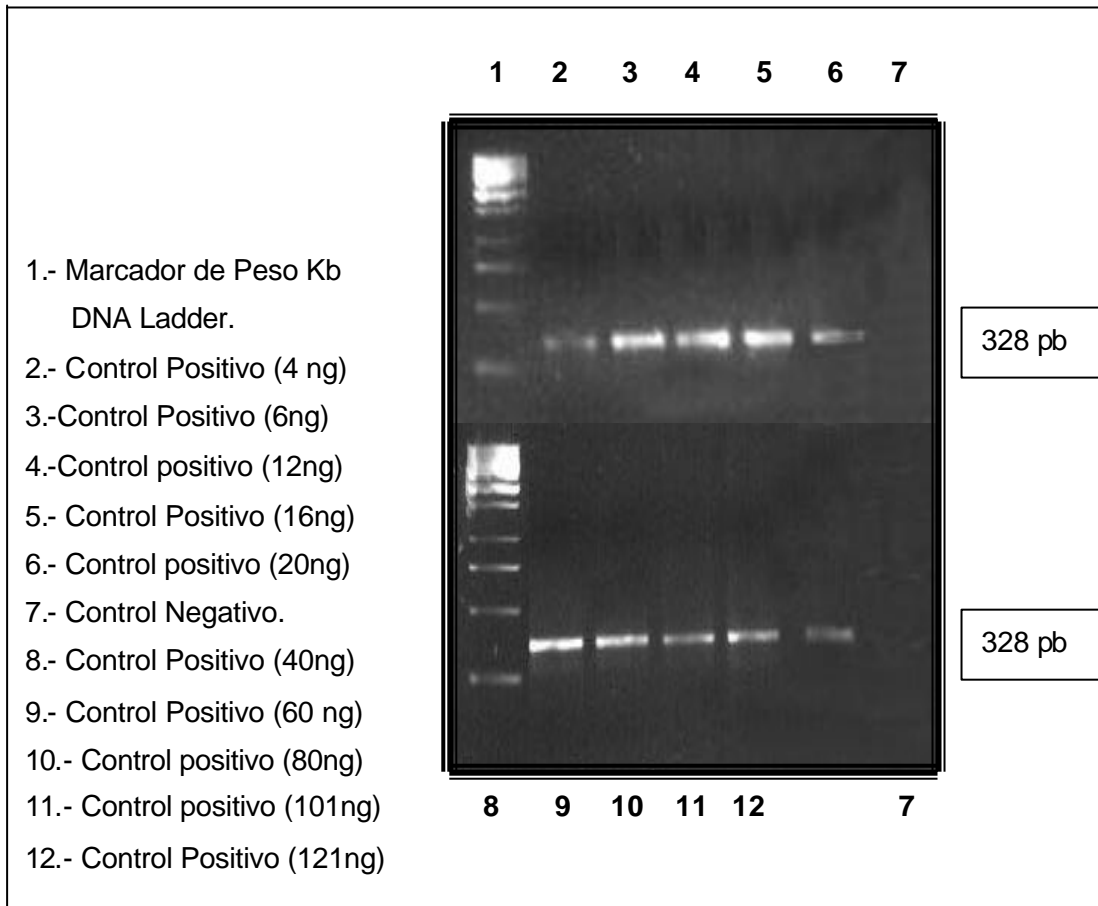


Figura 9: Distintas Concentraciones del Control Positivo.

8.4.2.- DIFERENTES TEMPERATURAS DE "ANNEALING".

Se procedió a variar las temperaturas de annealing, en el siguiente rango 50 - 60° C., obteniendo una banda más nítida, en las temperaturas de 55.5° C., 59.3 ° C., 59.8° C. Utilizando la siguiente solución:

Control + (40ng)	1 µl
Buffer 10X	5 µl
MgCl₂ 25mM	3 µl
DNTPs 10mM	1 µl
Np21 10pmol	2 µl
Np6 10pmol	2 µl
Taq 5U/ µl	0.3 µl
ADESI	35.7 µl
Total	50 µl

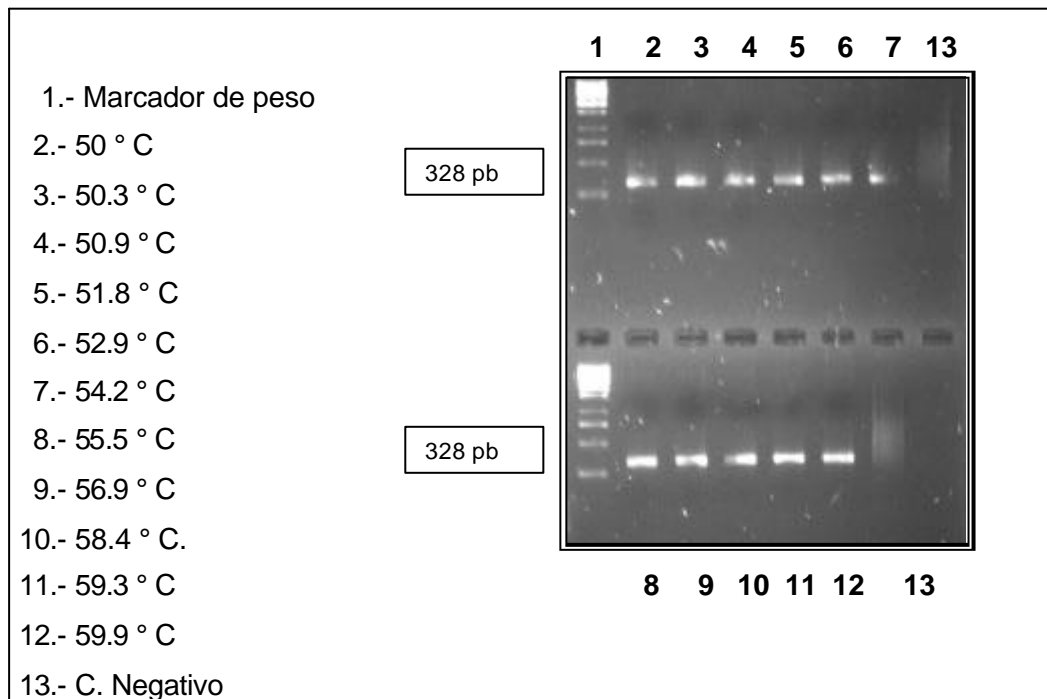


Figura 10: Diferentes Temperaturas de Annealing.

8.4.3.- NÚMERO DE CICLOS.

La última modificación que se realizó fue disminuir la cantidad de ciclos, desde 40 a 35 ciclos, obteniendo una banda nítida.

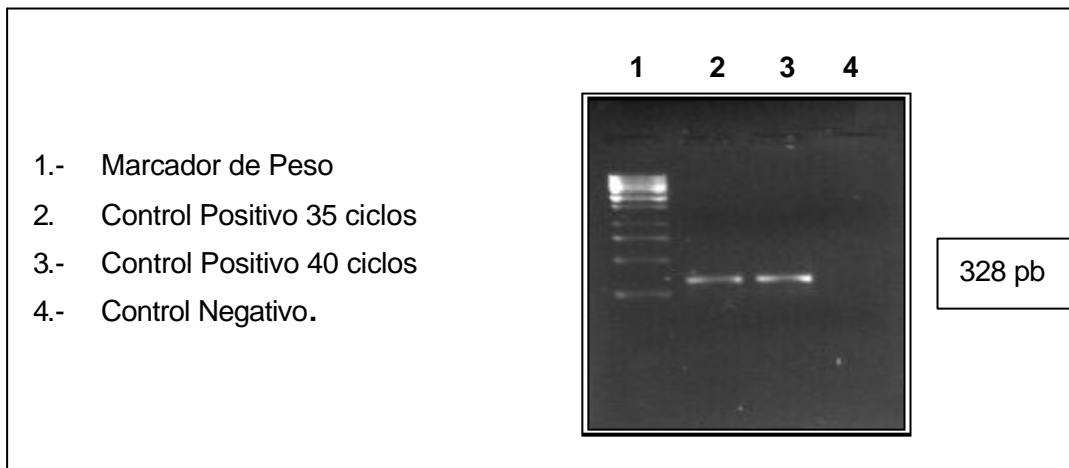


Figura 11: Control Positivo 35 ciclo.

8.4.4.- CONCENTRACIONES DE CLORURO DE MAGNESIO.

Se probaron distintas concentraciones, de Cloruro de Magnesio, teniendo un buen resultado entre los 2.5mM a 1.5mM, y como limite inferior 1mM.

Control+ (40ng)	1 µl	1 µl	1µl	1µl	1µl	Control -
Buffer 10X	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
MgCl₂ 25mM	5µl (2.5mM)	4 µl(2mM)	3 µl (1.5Mm)	2 µl(1mM)	1 µl(0.5mM)	3 µl
DNTPs 10mM	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Np21 10pMol	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Np6 10pMol	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Taq 5U/ µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl	0.3 µl
Adesi	33.7 µl	34.7 µl	35.7 µl	36.7 µl	37.7 µl	37.7 µl
Total	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

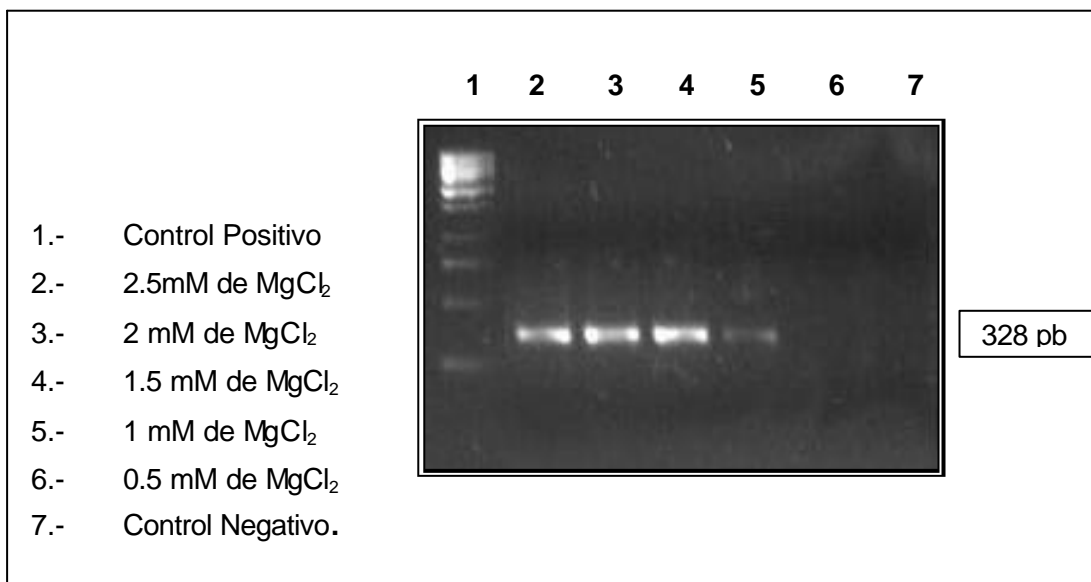


Figura 12: Distintas Concentraciones de Magnesio.

8.4.5.- PUESTA A PUNTO DE LA TECNICA EN CADENA DE LA POLIMERASA DEL CONTROL POSITIVO.

Por último, para poner a punto la técnica del control positivo, se concluye los siguientes volúmenes para la mezcla maestra:

Componente	Volumen	Concentración
Control Positivo	1?l	40ng
Buffer 10X	5?l	1X
MgCl ₂ 25mM	3?l	1.5mM
Dntps 100 mM	1?l	0.2mM
Primers(Np6) 10pmol	2?l	20pmol
Primers (Np21)10pmol	2?l	20pmol
Taq 5U/? l	0.3?l	1.5 U
Agua	34.7?l	
Total	50?l	

Tabla N° 2: Tabla Mezcla Maestra.

Esta solución fue colocada en el termociclador, siguiendo la siguiente secuencia de temperaturas. Comenzando por un ciclo de 95 ° C por 300 segundos, continuando con 40 ciclos, los que correspondieron a 94° C por 60 segundos, seguido de 55° C por 60 segundos y 74° C por 210 segundos, y una extensión a 74° C por 600 segundos. Posteriormente, la amplificación de DNA permaneció a 4 ° C hasta su proceso, para luego ser almacenado a – 20 ° C.

Dando como resultado la visualización de la banda de DNA por electroforesis, en un gel de agarosa al 2%.

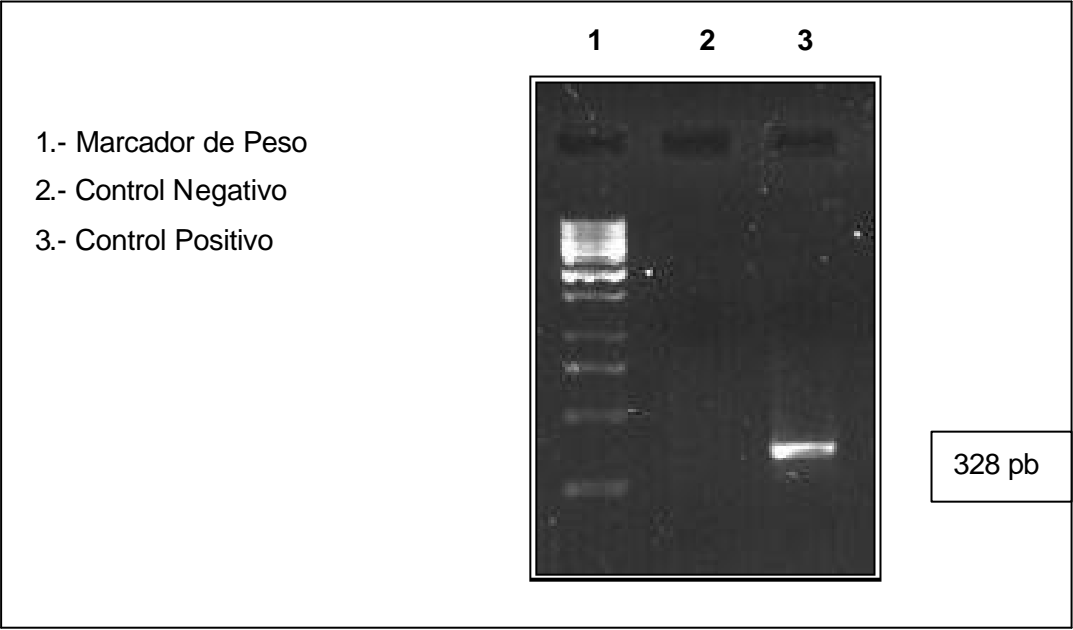


Figura 13: PCR Control Positivo.

9.- **DISCUSIÓN.**

En este estudio el objetivo primordial, fue estandarizar la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para el diagnóstico de ***Neospora caninum***, en tejido nervioso central de fetos bovinos abortados, por su gran importancia, como patógeno abortígeno, en la producción Bovina a nivel mundial. (Dubey J. P.; 2003).

Una de las características, por la cual, se decidió realizar esta técnica diagnóstica, fue la gran sensibilidad del PCR para detectar pequeñas cantidades del parásito, en variados tejidos.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, ha demostrando su ventaja diagnóstica, al ser comparada con otras técnicas de uso de rutina en algunos laboratorios diagnósticos como: Histopatológica, Inmunohistoquímica (Blaszler y col.; 1999).

En varios estudios de diagnóstico, de ***Neospora caninum*** por PCR queda de manifiesto, la amplia gama de partidores usados, las distintas cepas de este protozoo para ser analizadas, las distintas técnicas de amplificación del DNA y los diferentes tipos de tejidos para diagnosticar Neosporosis.

Collantes 2002, en su estudio cuantitativo sobre ***Neospora caninum***, trabajo con muestras de fetos bovinos naturalmente infectados, extrayendo DNA de cerebro tanto fresco, como fijado en parafina, describiendo la variaciones en cantidad y calidad, que existen entre estos dos tipos, dejando claro, que el último, presenta una marcada disminución de ambas variantes. Lo que concuerda con Lehmann G.,

2000, quien reporta, que los tejidos conservados en Formaldehído, por mas de una semana, sufren un marcado daño de los ácidos nucleicos, resultando solo trozos de DNA cuando se realiza la extracción.

Bazsler 1999; compara la sensibilidad del PCR, entre las extracciones desde tejidos en parafina y los frescos congelados, a los cuales se les diagnosticó Neosporosis, por histopatología; resultando en la primera de ellas un 100% de sensibilidad, no así en los congelados llegando solo a un 77%, concluyendo que una de las bases, para realizar un PCR, es el diagnóstico histopatológico.

Los controles internos, aunque en la mayoría de los estudios no son utilizados, tienen un gran valor a nivel diagnóstico, por cuanto deberían ser usados antes de realizar un PCR específico.

Collantes 2002 y Bazsler 1999, realizaron sus estudios, basándose en fetos bovinos abortados, infectados naturalmente, pero realizando antes del PCR una diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico.

Los partidores usados para esta tesis, Np6 y Np21 descritos por (*Yamage 1996*), fueron los mismos usados, por *Koyama, 2001*; y siguiendo las mismas condiciones del PCR; en cerebros de ratón inoculados con cultivos celulares de ***Neospora caninum***. Por cuanto, el diagnóstico por PCR para estos tiene mayores facilidades, por el tamaño del cerebro del ratón y teniendo claro que los ratones presentaban signos clínicos de Neosporosis.

Hill 2001 y Gondim 2004, utilizan los mismo partidores anteriormente nombrados, en la descripción de la técnica PCR, para ooquistes de perro y coyote respectivamente, lo que concuerda con lo descrito por *Yamage; 1996*, donde concluye, que estos

partidores son altamente sensibles para el diagnóstico de DNA derivado de Taquizoito.

Blazsles 1999; realiza el PCR utilizando cuatro partidores descritos por *Yamage* 1996; los cuales son Np4 - Np7, para luego repetir la amplificación con Np6 - Np7, obteniendo una banda 275 pares de bases; esto es utilizado para disminuir la contaminación con amplicones inespecíficos.

Para la realización de las condiciones de PCR, inicialmente, se utilizaron las descritas por *Yamage* 1996, obteniendo buenos resultados con los controles positivos, se probó las condiciones recomendadas por el *Dr: Bruno Gottstein*². Las que tuvieron mucho mejor resultado en el control positivo.

Este trabajo demuestra que la temperaturas de annealing, que puede ser utilizada para el PCR de ***Neospora caninum***, puede variar desde 55° C hasta 63° C, temperatura recomendada por *Müller* 1996, pero los 55° , 59° y 60° C, son las temperaturas que mejor calidad de la banda se observa.

Es importante tener en cuenta, que los estudios relacionados a la detección de DNA de ***Neospora caninum***, son realizados con inoculaciones, anteriores a la extracción de DNA.. (*Yamage M., 1996; Collantes E., 2002;*), lo que hace que tengan un marcado éxito; a diferencia de esta tesis donde las muestras fueron tomadas, con sola la sospecha de que estaban infectados con ***Neospora caninum***.

¹ Gottstein, B. Comunicación Personal Octubre 2003

El fragmento de DNA específico de *Neospora caninum*, fue descrito previamente por Kaufmann en 1995; pero aún, no se conoce a que zona del Protozoo codifica, esto fue consultado, al doctor J. Dubey³ y Bruno Gottstein¹, los que confirmaron esto, en forma personal.

¹ Gottstein, B. Comunicación Personal Octubre 2003

² Dubey, j. Comunicación Personal Mayo 2004

10.- CONCLUSIONES.

El trabajo realizado en el presente estudio, permitió, la realización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR en cultivo de ***Neospora caninum***, definiendo los parámetros limitantes de la reacción, y logrando la estandarización de esta.

Las concentraciones límites para una reacción positiva de PCR, fueron las de 4.04 ng / μ l y 121.1 ng/ μ l; la concentración ideal para una reacción positiva de PCR, es de 40.4 ng/ μ l.

La temperatura de annealing, es un parámetro importante, para la obtención de un PCR positivo, siendo para ***Neospora caninum*** las temperaturas ideales las de 55, 59 y 60 ° C., concordando con los trabajos revisados. Estandarizándose en 55°C.

Las concentraciones de Magnesio, es otro de los parámetros de mayor importancia en una Reacción de Polimerasa en Cadena, teniendo una buena reacción en 1.5 mM de Cloruro de Magnesio. Y teniendo como concentración límite 1 mM.

La variación de los números de ciclos, demostró, que los 35 y 40 ciclos, tienen un buen resultado, pero lo recomendado por la mayoría de los autores revisados, aconsejan que los 40 ciclos es lo ideal para Un PCR de ***Neospora caninum***.

Todos esto nos lleva a demostrar la gran importancia que tiene este estudio, ya que logro dilucidar los parámetros ideales para el diagnóstico a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR de ***Neospora caninum***. Lo que puede ser extrapolado en un laboratorio de Diagnóstico Veterinario.

11.- BIBLIOGRAFÍA.

Anderson, M.L., Blanchard, P.C., Barr, B.C., Dubey, J.P., Hoffman, R.L., And Conrad, P.A. 1991. *Neospora*-like Protozoan Infection as a Major Cause of Abortion in California dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198: 241 - 244.

Anderson, M.L., B.C. Barr, P.A. Conrad 1994. Protozoal Causes of Reproductive Failure In Domestic Ruminants. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* 10: 439 - 461.

Anderson, M. L., C. W. Palmer, M. C. Thurmond, J.P. Picanso, P.C. Blanchad, R. E. Breitmeyer, A. W. Layton, M. Mcallister, B. Daft, H. Kinde, y col. 1995. Evaluation of abortions in cattle attributable to Neosporosis in selected dairy herds in California. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207: 1206 – 1210.

Anderson, M.L., J.P. Reynolds, J.D. Rowe, K.W. Sverlow, A.E. Packhem, B.C. Barr, P.A. Conrad, 1997. Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 210: 1.169 - 1.172.

Anderson, M. L., A.G. Andrianarivo, P.G. Conrad. 2000. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science* 60-61: 417 - 431.

Andrianarivo, A. G. Choromanski, L. McDonough, S. P. ; Packham, A. E.; Conrad P. A. 1999: Immunogenicity of a killed whole *Neospora caninum* tachyzoite preparation formulated with different adjuvants. *International journal for Parasitology* 29: 1.673 – 1.625.

Antony, A., And N. B. Williams. 2001. Recent advance in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. *New Zealand veterinary Journal* 49: 42 - 47.

Baszler T., L. Gay, M. Long And B. Mathison.1999. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissue from spontaneous bovine abortions. *Journal of Clinical microbiology* . Dec.: 4.059 – 4.064.

Barr, B.C., M.L. Anderson, P.C. Blanchard, B.M. Daft, H. Kinde, P.A. Conrad, 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Vet. Pathol.* 27: 354 -361.

Barr, B.C., Conrad, P.C., Sverlow, K., Tarantal, A.F., And Hendrickx, A.G. 1994. Experimental fetal and transplacental *Neospora* infection the nonhuman primate. *Laboratory Investigations* 71: 236-242.

Belak, A.; Ballagi-Pordany A. 1989 Detection of Pseudorabies Virus DNA Sequences by the Polimerase Chain Reaction. *Arh Virol.* 108: 279-286.

- Bjerkas**, I., M. C. Jenkins, And J. P. Dubey. 1994. Identification and characterization of *Neospora caninum* tachyzoite antigens useful for diagnosis of Neosporosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1: 214-221.
- Bjorkman**, C., A. Lunden, O.J.M. Holmdahl, J. Barber, A.J. Trees, A. Uggla, 1994. *Neospora caninum* in dogs: detection of antibodies by ELISA using an iscom antigen. *Parasite. Immunol.* 16 : 643-648.
- Bjorkman**, C., Johansson S., Stenlund O. J: M., Holmdahl. And A. Uggla. 1996. Neospora species infection en a herd of dairy cattle. *Journal of the American veterinary medical Association* 208: 1441-1444.
- Bjorkman**, C., Uggla A., 1999. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *International Journal for Parasitology* 29: 1497-1507.
- Collantes-Fernandez**, E., Zaballos A., Alvarez-Garcia G., And Ortega –Mora Luis. 2002. Quantitative detection of *Neospora caninum* in Bovine Abortos Fetuses and Experimentally Infected mice by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology.* 1194-1198.
- Conrad**, P., Sverlow, K., Anderson, M., Rowe, J., Bondurant, R., Tuter, G., Breitmeyer, R., Palmer, C., Thurmond, M., Ardans, A., Dubey, J.P., Duhamel, G. And Barr, B. 1993. Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 5: 572-578.
- Davison** Hc., Guy Cs., MCGarry Jw, Guy F., Williams D., Trees Aj.,2001. Experiemntal Studies on the transmission of *Neospora caninum* between cattle. *Res. Vet. Sci.* 70: 163-168.
- De Marez**, T.; S. Liddell; J. P. Dubey, M. C. Jenkins And L. C. Gasbarre., 1999. Oral infection el calves with *Neospora caninum* oocysts from dog: Humoral an cellular immune responses. *InternationalJournal for Parasitology* 29: 1647-1657.
- De Robertis** E . *Biología Celular y Molecular* 2001, Editorial T. G. Color Efe, Buenos Aires, Argentina, pp 77-79.
- Dubey**, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A., Topper, M.J., And Uggla, A. 1988: Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192: 1269-1285.
- Dubey** J.P., Hattel, A.L., Lindsay D.S. And Topper J.M., 1988. Neonatal *Neospora caninum* infection in dog; isolation of the causative agent and experimental transmission. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 93: 1259-1263.
- Dubey** Jp., Koestner A., Piper Rc. 1990. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dog. *J. Am. Vet. Med Assoc.* 197: 857-860.

- Dubey, J.P.** 1993. Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other tissue cyst-forming coccidia of humans and animals. In: J.P. Kreier (Editor). Parasitic Protozoa. Vol. 6. Academic Press., NY. Pp. 1-158.
- Dubey, J., Lindsay, D., Adams, D., Gay, J.M., Bazler, T., Blagburn, B. And Thulliez, P.** 1995. Serologic responses of cattle and other animals infected with **Neospora caninum**. *Am. J. Vet. Res.* 57: 329-336.
- Dubey, J.P. And Lindsay, D.S.** 1996. A review of **Neospora caninum** and Neosporosis. *Vet. Parasitol.* 67:1-79.
- Dubey, J.P.; D.S. Lindsay, D.S. Adams, J.M. Gay, T.V. Baszler, B.L. Blagburn, P. Thullies,** 1996. Serologic responses of cattle and other animals infected with **Neospora caninum**. *Am. J. Vet. Res.* 57: 329-336.
- Dubey, J.P.** 1999A. Neosporosis in cattle: biology and economic impact. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214: 1160-1163.
- Dubey, J.P.** 1999b. Recent advances in Neospora and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 84: 349-367.
- Dubey, Jp., Barr Bc., Barta Jr, y col.** 2002. Redescription of **Neospora caninum** and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol* 32: 929-946.
- Dubey J. P.** 2003a review of **Neospora caninum** and neosporosis in animals. THE KOREAN journal of parasitology. Vol 41, N°1, 1-16.
- Dubey J. P.** 2003b Neosporosis in cattle. *J. Parasitol* 89 (suppl..) pp 842-856
- Ellis, J, Luton, K., Baverstock, P., Brindley, P.J., Nimmo, K.A., Johnson, A.M.** 1994. The phylogeny of **Neospora caninum**. *Mol. Biochem. Parasitol.* 64: 303-311.
- Gazzinelli R.T., Denkers E.Y., Sher A.,** 1993. Host resistance to **Toxoplasma Gondii**: Model for studying the selective induction of cell-mediated immunity by intracellular parasite. *infect. agents Dis.* 2,139-149.
- Gondim L., Mcallister M., Pitt W., Zemlicka D.** 2004. Coyotes (Canis latrans) are definitive host of **Neospora caninum**. *International Journal for Parasitology* 34: 159-161.
- Gottstein, B., B. Hentrich, R. Wyss, B. Thur, A. Busato, K.D. Stark .**1998. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. *Int. J. Parasitol.* 28: 679-691.
- Helman, R.G., Stair, E.L. Lehenbauer T. W., Rodgers S., And Saliki J.T.,** 1998: Neosporal abortion in Oklahoma cattle with emphasis on the distribution of brain lesions in aborted fetuses. *Journal of veterinary Diagnostic Investigation* 10: 292-295.

Hein W. R., Shelyon J.N., Simpson-Morgan M-W., Morris B., 1988, Traffic and proliferative responses of recirculating Lymphocytes in fetal calves. *Immunology* 64, 621-626.

Higgins D.A., Stack M.J.; Richarson C., 1983. Lymphocyte marks in the bovine foetus. *Dev. Comp. Immunol.* 7, 369-377

Hill D., Liddell S., Jenkins M., Dubey J.P. 2001. Specific Detection of ***Neospora caninum*** Oocysts in Fecal Sample from experimentally – infected Dogs using the Polymerase chain Reaction. *J. Parasitol* 87(2): 395-398.

Holmdahl, O.J., Mattson, J.G., Ugla, A., Johnson, A.M. 1994. The philogeny of ***Neospora caninum*** and ***Toxoplasma gondii*** based on ribosomal RNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 119: 187-192.

Innes E., Andrianarino A., Bjorkman C. 2002. Immune response to ***Neospora caninum*** and prospects for vaccination. *Trends Parasitol* 18: 497-504.

Jersen J., Rubino M., Yang W.C., Cooley A.C., Schultz R.D., 1988. Ontogeny of mitogen responsive lymphocyte en the bovine foetus. *Dev. Comp. Immunol.* 12, 685-692.

Kaufmann H., Yamage M., O. Flechtner, And B. Gottstein. 1995. Klonierung eirner Neospora – Spezifischen diagnostischen DNA – sonde Schweizerische Medizinische Wochenschrift 125: 930 (abstract).

Koyama T., Kobayashi Y., Omata Y., Yamada M., Furuoka H., Maeda R., Matsui R., Salyo A. And Mikami T. 2001. Isolation of ***Neospora caninum*** from the Brain of Pregnant Sheep. *J. Parasitol*, 87 (6): 1486-1488.

Lally, N.C. M.C. Jenkins, J.P. Dubey 1996. Evaluation of two ***Neospora caninum*** recombinant antigens for use in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine neosporosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 3: 275-279.

Lindsay, D.S. And Dubey, J.P. 1989. Immunohistochemical diagnosis of ***Neospora caninum*** in tissue sections. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1981-1983.

Lindsay D., Speer C., Toivio-Kinnucan M., y col. 1993. Use of infected culture cells to compare ultrastructural featus of ***Neospora caninum*** from dogs and ***Toxoplasma gondii***. *Am J Vet Res.* 54: 103,

Lindsay D., Dubey J., Duncan R., 1999a. Confirmation that the dog is a definitive host for ***Neospora caninum***. *Vet Parasitol* 82: 327-333.

Lindsay D., Upton S., Dubey J., 1999b. A structural study of the ***Neospora caninum*** oocysts. *Int J. parasitol* 29: 1521-1523.

Mcallister, M.M., E.M. Huffman, S.K. Hietela, P.A. Conrad, M.L. Anderson, M.D. Salman, 1996. Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8: 355-357.

Mcallister, M.M., Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Jolley, W.R., Wills, R.A., Mcguirre, A.M. 1998. Dogs are definitive hosts of ***Neospora caninum***. *Int. J. Parasitol.* 28: 1473-1478.

Mcallister M., Bjorkman C., Anderson-Spreched R., Rogers D., 2000. Evidence of point-source exposure to ***Neospora caninum*** and their possible association with fetal loss. *Vet Parasitol* 105: 881-887.

Moore D., Poso M., Odeon A., Campero C., 2000. Caracterización histopatológica de lesiones causadas por ***Neospora caninum*** en el sistema nervioso central de los fetos bovinos abortados. Segunda reunión Argentina de Patología Veterinaria 27 al 29 de septiembre. Resúmenes pag. 127.

Moore D., Odeon A., Campero C., 2001. Neosporosis bovina: una actualización. *Vet Arg.* Vol. XVIII. N° 180: 752-775.

Meléndez P., Concha C., Donovan A., Björkman C., 1999. Evidencia serologica de ***Neospora caninum*** en un rebaño lechero de la zona central de Chile., *Avances en ciencias veterinarias* vol. 14 N° 1 y 2.1999.

Muller N., Zimmermann V., Hentrich B., Gottstein B., 1996. Diagnosis of ***Neospora caninum*** and ***Toxoplasma Gondii*** Infection by PCR and DNA hybridisation Immunoassay. *Journal of clinical Microbiology.* Nov., 2850-2852.

Olds, D., Cooper, T., And Thrift, F.A. 1979 Effect of days open on economic aspects of current lactation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 62: 1167-1170.

Osawa, T., J. Wastling, S. Maley, D. Buxton, E.A. Innes 1998. A multiple antigen ELISA to detect *Neospora* - specific antibodies in bovine sera, bovine foetal fluids, ovine and caprine sera. *Vet. Parasitol* 79: 19-34.

Packham A., Sverlow K., Conrad P., Loomis E., Rowe J., Anderson M., Marsh A., Cray C., Barr B., 1998: A Modified Agglutination test for ***Neospora caninum***: Development, Optimizacion, and comparision to the Indirect Fluorescent-antibody Test and Enzyme – Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5: 467-473.

Paré, J., Hietala,S.K., Thurmond, M.C. 1995a. Interpretation of an indirect fluorescent antibody test for diagnosis of *Neospora* sp. Infection in cattle. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7: 273-275.

Pare, J., Hietala, S. And Thurmond, M.C. 1995b: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp. infection in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 7: 352-359.

- Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K.** 1996. Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calthood mortality. *Can. J. Vet. Res.* 60: 133-139.
- Paré, J., Thurmond, M.C., Hietala, S.K.** 1997. *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. *J. Parasitol.* 83: 82-87.
- Patitucci, A.N.** 1994. *Neospora* and abortion in New Zealand dairy cattle. Thesis of Master Philosophy in Veterinary Science, Massey University, New Zealand.
- Patitucci, A.N., Alley, M.R., Jones, B.R. Charleston, W.A.G.** 1997. Protozoal encephalomyelitis of dogs involving *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in New Zealand. *N Z vet. Journal* 45: 231-235.
- Patitucci, A.N., W.A.G. Charleston, M.R. Alley, R.J.O. O'Connor, W.E. Pomroy,** 1999a. Serological study of a dairy herd with a recent history of *Neospora* abortion. *N. Z. vet. Journal* 47: 28-30.
- Patitucci, A.N., M.J. Perez, C.F. Luders, M.H. Ratto, A.G. Dumont,** 1999b. Evidencia serológica de infección por *Neospora caninum* en rebaños lecheros del sur de Chile. *Arch. Med. Vet.* 31: 2.
- Patitucci, A.N., M.J. Perez, K.F. Israel, M.A. Rozas,** 2000. Prevalencia de anticuerpos séricos contra *Neospora caninum* en dos rebaños lecheros de la IX Región de Chile. *Arch. Med. Vet.* 2: 209-214.
- Patitucci, A.N., M.J. Pérez, M.A. Rozas, K.F. Israel,** 2001. Neosporosis canina: presencia de anticuerpos séricos en poblaciones caninas rurales y urbanas de Chile. *Arch. Med. Vet.* 2: 209-214.
- Petersen M., Lutkefels E., Heckeroth A., Schares G.** 2001. Immunohistochemical and Ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue cysts in skeletal muscles of naturally infected dog and cattle. *Int J. parasitol* 31: 1144-1148.
- Reichel, M.P.** 2000. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. *Australian Veterinary Journal* 78: 258-261.
- Rimstad E., Evensen O.** 1993. The identification of Equis herpesvirus in Paraffin embebed Tissues for aborted fetuses by Polymerise Chain reaction and Immunohistochemical. *J. Vet Diag. Invest.* 5: 174-183.
- Romand, S., P. Thullies, J.P. Dubey,** 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitol. Res.* 60: 50-53.
- Shivaprasad, H. L., R. Ely., And J.P. Dubey,** 1989. A *Neospora* -like protozoon found in an aborted bovine placenta. *Veterinary parasitology.* 34, 145-148.
- Spper C: A., Dubey J.P., Mcallister M.M.; Blixt J.A.** 1999. Comparative ultrstructure

of tachyzoites, bradyzoites, and tissue cysts of ***Neospora Caninum*** and ***Toxoplasma gondii***. *International Journal For Parasitology* 29: 1509-1519

Tenter A., K. Luton And M. Johnson. 1994. species – specific identification of Sarcocystis and Toxoplasma by PCR amplification of small subunit ribosomal RNA gene fragments. *Applied parasitology* 35: 173 – 188.

Thurmond M., Hietala S. 1995. Strategies to control Neospora infection in Cattle. *The bovine Practitioner* 29: 60-63.

Tizard I. 1995. *Inmunología Veterinaria*. Edt. Interamericana: Mcgraw – Hill. Cuarta edición. México.

Trees, A.J., F. Guy, J.C. Low 1994: Serological evidence implicating *Neospora* sp. as a cause of abortion in British cattle. *Vet Rec* 134: 405-407.

Ugbla A., Stenlund S., Holmadahl O., Jakubek E., Thebo P., Kindahl H., Bjorman C. 1998. Oral ***Neospora caninum*** inoculation of neonatal calves. *International Journal for Parasitology* 28: 1467-1472.

Wouda, W.; J. Brinkhof, C. Van Maanen, A.L.W. De Gee And A.R. Moen 1998. Serodiagnostic of Neosporosis in Individual cows and dairy herds: a comparative Study of three ELISA. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5: 711-716.

Wuoda W., Moen A., And Schukken Y. 1998: Abortion risks in progeny of cow after a *Neospora caninum* epidemic. *Theriogenology* 49: 1311-1316.

Yamage Mat, Oliver Flechtner And Bruno Gottstein. 1996. ***Neospora caninum***: specific Oligonucleotide primers for the detection of brain "cyst" DNA of experimentally infected Nude mice by the polimerase chain reaction (PCR). *Journal Parasitology* 82 (2):p272-279.

Yamane I., Shibahara T., Kokuho T., Shimura K., Hamaoka T., Haritani M., Conrad P., Park C., Sawada M., Umemura T., 1998. An improved isolation technique for bovine *Neospora* species. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10: 364-368.