



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Aislamiento, Caracterización
Morfológica y Molecular Preliminar de
Neospora caninum de Fetos Bovinos
Abortados de Cundinamarca y Cesar.**

Susana Moreno Chaparro

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2019

Aislamiento, Caracterización Morfológica y Molecular Preliminar de *Neospora caninum* de Fetos Bovinos Abortados de Cundinamarca y Cesar.

Susana Moreno Chaparro

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al

título de:

Magister en Ciencias – Microbiología

Director:

Fabio Ancizar Aristizabal Gutiérrez

Químico Farmacéutico, PhD

Codirector (a):

José Luis Azumendi Olló

Médico Veterinario

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2019

Dedicatoria

A mi familia

Agradecimientos

Ofrezco mis agradecimientos al director de tesis Fabio Ancizar Aristizábal Gutiérrez por apoyarme y orientarme en la elaboración de la tesis.

Gracias al codirector, el Doctor José Luis Azumendi Olló, por brindarme su confianza, orientarme, apoyarme y guiarme hacia el mundo de la ciencia de la mano de Dios.

Asimismo, mis agradecimientos a la Fundación Colombiana de Estudios de Parásitos por su aporte financiero, a los laboratorios de Farmacogenética de cáncer y de Caracterización Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, por prestarme sus instalaciones, equipos y orientación en el desarrollo de pruebas de laboratorio.

Resumen

En Colombia, se han reportado estudios de seroprevalencias de Neosporosis Bovina hasta del 90% y lesiones histopatológicas en fetos abortados provenientes de plantas de beneficio. Se tiene como objetivo contribuir a la caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Neospora caninum* de fetos bovinos abortados en fincas con características epizootológicas de Neosporosis Bovina de Cundinamarca y Cesar. Se identificó mediante las técnicas de histopatología, inmunohistoquímica e inmunocitoquímica la presencia de *N. caninum* en cerebros de fetos abortados. Posteriormente, se obtuvo aislamientos clonales del protozooario en cultivos celulares. Fueron evaluados 6 fetos abortados, tejidos de dos terneros fallecidos días después de nacer, de una vaca adulta y una placenta. En los resultados de necropsia e histopatología se evidenciaron hemorragia, congestión y procesos autolíticos, siendo el cerebro el órgano más afectado. De igual manera, se observaron quistes tisulares en las muestras de tejido cerebral. Posteriormente, la presencia de *N. caninum* fue confirmada mediante inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en todos los cerebros de fetos abortados, el cerebro de vaca adulta y placenta. En los aislamientos de *N. caninum*, se encontró efecto citopático a partir de las 24, 48 a 72 horas PI. Por su parte, el 100% de las muestras fueron positivas a la prueba de qPCR.

En conclusión, la Neosporosis Bovina en Colombia es una enfermedad importante en el ganado. Los estudios de aislamiento, la morfología y la caracterización molecular contribuyen a ampliar los conocimientos sobre esta enfermedad. Además, pueden ser el punto de partida para los estudios que buscan establecer estrategias de control y prevención, y el desarrollo de técnicas estandarizadas para pruebas moleculares.

Palabras clave: Neosporosis Bovina, *Neospora caninum*, Aborto, aislamiento.

Abstract

In Colombia, Neosporosis Bovine seroprevalence studies have been reported. These studies showed about 90% of seroprevalence. Another study reported the histopathology lesions of aborted fetuses from slaughterhouses. The principal aim of this project is to contribute to the morphology characterization and isolation molecular of *Neospora caninum* of bovine aborted fetuses from two farmers of Cundinamarca and Cesar departments. *Neospora caninum* was identifying through histopathology, immunohistochemistry and immunocytochemistry assays. Then, this microorganism was isolate and cloned in cell cultures.

Six aborted fetuses, tissues of two calves died later days of birth, one tissues of adult cow and a placenta were evaluated. Results of necropsy and histopathology showed hemorrhage, congestion, autolysis, being the brain the most affected organ. Tissues cysts were observed in brain tissues. *Neospora caninum* was confirmed in all brain samples of fetuses and adult cow through immunohistochemistry and immunocytochemistry. On the other hand, in the isolations of *Neospora caninum*, cytophatic effect was found between 24, 48 to 72 hours post infections. qPCR analysis indicated that all brain samples were positive for *N. caninum*

In conclusion, the Neosporosis Bovine is a significant disease in cattle in Colombia. Isolation studies, morphology and molecular characterization contribute to expand the insights about this disease, and they can be the starting point for studies looking for establish strategies of control and prevention. Finally, create of standardized molecular techniques.

Keyword: Neosporosis Bovine, *Neospora caninum*, Abort, isolation.

Contenido

Resumen.....	IX
Abstract.....	X
Contenido.....	XI
Figuras.....	XIII
Lista de tablas.....	XVI
Introducción.....	1
1. Marco Conceptual.....	3
1.1. Morfología de <i>Neospora caninum</i>	4
1.2. Ciclo de vida y transmisión.....	5
1.3. Signos clínicos.....	7
1.4. Estudios de <i>Neospora caninum</i> en el ámbito internacional.....	8
1.5. <i>Neospora caninum</i> en Colombia.....	10
1.6. Bioensayos de <i>Neospora caninum</i>	13
1.7. Ensayos de aislamiento y caracterización de <i>Neospora caninum</i> en cultivos celulares.....	14
2. Metodología.....	17
2.1. Criterios de inclusión y exclusión para el estudio de <i>Neospora caninum</i>	17
2.2. Evaluación de lesiones macroscópicas y microscópicas.....	18
2.3. Detección Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en cerebros y placenta.....	18
2.4. Obtención de <i>Neospora caninum</i> a partir de cerebro de feto abortado.....	19
2.5. Evaluación de efecto citopático y expansión del aislamiento clonal en la línea celular Vero.....	19
2.5.1. Evaluación inmunocitoquímica de células vero-infectadas.....	20
2.6. Detección molecular.....	20
2.6.1. Evaluación de métodos de extracción de DNA y cuantificación de producto de extracción.....	20
2.6.2. Aplicación de la técnica PCR Convencional en productos de extracción.....	22
2.6.3. Implementación de la técnica de PCR en Tiempo Real en células Vero-infectadas.....	22

2.6.4.	Cuantificación de producto de PCR.....	22
2.7.	Identificación de polimorfismo	22
3.	Resultados	23
3.1.	Evaluación de lesiones macroscópicas y microscópicas	23
3.2.	Detección Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en cerebros y placenta.....	36
3.3.	Evaluación del efecto citopático y expansión del aislamiento clonal en la línea celular Vero.....	43
3.3.1.	Evaluación inmunocitoquímica de células vero-infectadas.	49
3.4.	Detección molecular	52
3.4.1.	Evaluación de métodos de extracción de DNA y cuantificación de producto de extracción.....	52
3.4.2.	Aplicación de la técnica PCR Convencional en productos de extracción infectadas con Neospora caninum y Cuantificación de producto de PCR.....	54
3.4.3.	Implementación de la técnica de PCR en Tiempo Real en células Vero-infectadas.....	55
4.	Discusión.....	57
5.	Conclusiones y recomendaciones.	64
5.1.	Conclusiones.....	64
5.2.	Recomendaciones.....	65
	Bibliografía	66

Figuras

FIGURA 1. CICLO DE VIDA Y TRANSMISIÓN DE NEOSPORA CANINUM	6
FIGURA 2 NECROPSIA DE FETO 010517-12.	24
FIGURA 3. HISTOPATOLOGÍA DE CEREBRO DE FETO 010517-12.	24
FIGURA 4. FETO ABORTADO 7 MESES.....	25
FIGURA 5. HISTOPATOLOGÍA DE CEREBRO DE FETO 020517-15.	26
FIGURA 6. FETO BOVINO ABORTADO 010617-16.	27
FIGURA 7. HISTOPATOLOGÍA DE CEREBRO FETO 010617-16.....	27
FIGURA 8 FETO ABORTADO 010817-18.	28
FIGURA 9. RESULTADO DE HISTOPATOLOGÍA DE CEREBRO DE FETO 010817-18..	29
FIGURA 10. FETO ABORTADO DE 6 MESES. 010917-19.....	29
FIGURA 11. CORTES HISTOPATOLOGÍA DE CEREBRO 010917-19..	30
FIGURA 12.FETO BOVINO ABORTADO DE 3 MESES..	31
FIGURA 13. RESULTADOS MICROSCÓPICOS FETO ABORTADO 011217-20.....	31
FIGURA 14. RESULTADOS DE HALLAZGOS MICROSCÓPICOS DE CEREBRO DE VACA ADULTA 10517-15.	32
FIGURA 15. RESULTADO DE HALLAZGOS MICROSCÓPICOS DE PLACENTA DE FETO BOVINO ABORTADO 20917-7.....	33
FIGURA 16. RESULTADOS HALLAZGOS MICROSCÓPICOS DE CEREBRO TERNERO 10417-11.	34
FIGURA 17. RESULTADOS DE HALLAZGOS MICROSCÓPICOS DE TERNERO 10517-15.	35
FIGURA 18. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUIMICA DE CEREBRO DE FETO ABORTADO 010517-12.....	36
FIGURA 19. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUIMICA DE CEREBRO ABORTADO DE FETO 020517-15.	37

FIGURA 20 INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA DE CEREBRO DE FETO ABORTADO 010617-16.....	38
FIGURA 21INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA DE CEREBRO DE FETO ABORTADO 010817-18.....	39
FIGURA 22INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA DE CEREBRO DE FETO ABORTADO 010917-19.....	40
FIGURA 23INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA DE CEREBRO DE FETOS ABORTADOS 011217-20.....	41
FIGURA 24 INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA DE CEREBRO VACA ADULTA 10517.	41
FIGURA 25 INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA DE PLACENTA 20917-7.....	42
FIGURA 26 EXPANSIÓN CLONAL DE NEOSPORA CANINUM 010517-12 EN CÉLULAS VERO.....	43
FIGURA 27 EXPANSIÓN CLONAL DE NEOSPORA CANINUM 020517-15 EN CÉLULAS VERO.....	44
FIGURA 28 EXPANSIÓN CLONAL DE NEOSPORA CANINUM 010617-16 EN CÉLULAS VERO.....	45
FIGURA 29EXPANSIÓN CLONAL DE NEOSPORA CANINUM 010817-18 EN CÉLULAS VERO.....	46
FIGURA 30EXPANSION CLONAL DE NEOSPORA CANINUM 010917-19 EN CÉLULAS VERO.....	47
FIGURA 31EXPANSION CLONAL DE NEOSPORA CANINUM 011217-20 EN CÉLULAS VERO.....	48
FIGURA 32 INMUNOCITOQUÍMICA EN CÉLULAS VERO POST-INFECCIÓN 010517-12.	49
FIGURA 33INMUNOCITOQUÍMICA EN CÉLULAS VERO POST-INFECCIÓN 020517-15.	49
FIGURA 34INMUNOCITOQUÍMICA EN CÉLULAS VERO POST-INFECCIÓN 010617-16.	50
FIGURA 35INMUNOCITOQUÍMICA EN CÉLULAS VERO POST-INFECCIÓN 010817-18.	50
FIGURA 36INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS VERO POST-INFECCIÓN 010917-19.	51
FIGURA 37INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS VERO POST-INFECCIÓN 011217-20.	51
FIGURA 38.VISUALIZACIÓN DE AMPLIMERO 010517-12. AMPLIFICACIÓN DE LA MUESTRA NÚMERO 1.....	54

FIGURA 39 CURVAS DE AMPLIFICACIÓN DE PCR EN TIEMPO REAL DE CÉLULAS VERO-
INFECTADAS..... 56

Lista de tablas

TABLA 1. ESTUDIOS DE NEOSPORA CANINUM EN COLOMBIA.....	12
TABLA 2. MUESTRAS SELECCIONADAS PARA EL ESTUDIO.....	17
TABLA 3. METODOS DE EXTRACCION DE DNA DE NEOSPORA CANINUM.....	21

Introducción

Neosporosis Bovina es una enfermedad reproductiva causada por el protozooario *Neospora caninum*. La enfermedad tiene como signo principal abortos, existen otras complicaciones como reabsorción fetal, repetición de celos, muerte perinatal entre otras. En 1989 se reportan los primeros aislamientos a partir de cerebro de perros y cordón espinal y su identificación mediante la inmunohistoquímica. A partir de este estudio se han desarrollado variedades de aislamientos en el ámbito mundial, identificando aislamientos en países como Estados Unidos (Dubey *et al.*, 1988^a), España (Caspe *et al.*, 2012), China (Hao *et al.*, 2014), Japón (Yamane *et al.*, 1997), Brasil (Locatelli-Dittrich *et al.*, 2004), Argentina (Campero *et al.*, 2015), entre otros países.

Neospora caninum ha sido aislado de diferentes animales, tal como; vaca adulta, fetos abortados, teneros infectados experimentalmente, caninos, así como en ratones de laboratorio, estos últimos han sido usados según los estudios para obtener taquizoitos y como índice para medir el grado de infectividad de los aislamientos de *Neospora caninum*. Estos avances han permitido establecer estrategias para la prevención de la enfermedad. Con base en lo anterior, este estudio se basa en la evaluación de cerebros de fetos abortados y el aislamiento de *N. caninum*.

Los estudios de seroprevalencia realizados en Colombia, demuestra la presencia de *Neospora caninum* en las fincas colombianas. Es importante profundizar en el conocimiento epizootiológico de esta enfermedad, es decir, la identificación de todos los factores bióticos y abióticos que influyen en el ciclo de vida y comportamiento de *Neospora caninum*.

La elaboración de este trabajo buscó contribuir a la identificación caracterización morfológica y molecular de aislamientos de *Neospora caninum* de fetos bovinos abortados en fincas con características epizootiológicas de Neosporosis Bovina de Cundinamarca y Cesar. Para el cumplimiento de este objetivo se tuvo como estrategia la identificación morfológicamente por medio de las técnicas de histopatología e inmunohistoquímica la presencia del parasito *N.*

caninum en cerebros de fetos abortados en las fincas en estudio. Posteriormente, se obtuvo aislamientos clonales de *Neospora caninum* en cultivos de células vero a partir de los cerebros de fetos abortados. A los aislamientos obtenidos les realizó PCR en tiempo real y convencional y la identificación de microsatélites.

Los resultados obtenidos servirán como base para el desarrollo de nuevos estudios en otras regiones del país, específicamente donde se reportaron seroprevalencias de la enfermedad. Así mismo, contribuir en la creación e implementación de medidas de prevención, control de la Neosporosis Bovina, también la creación de protocolos de envío y remisión de fetos abortados, tejidos de terneros o animales adultos y de suero. Las estrategias anteriores, buscan disminuir los riesgos de aborto u otras complicaciones reproductivas, contribuyendo a mejorar la salud de los animales, disminuir las muertes por pérdidas durante o después de la preñez, aumentar la producción de leche y carne, y finalmente, reducir gastos y pérdidas económicas.

Por su parte, el conocimiento de *Neospora caninum*, es un aporte importante en los avances científicos del país, ya que es posible la elaboración de técnicas diagnósticas específicas para la detección de la enfermedad en Colombia y para su adecuado tratamiento.

Finalmente, este estudio buscó que Neosporosis Bovina sea parte del grupo de enfermedades infecciosas reproductivas importantes en el ganado bovino. Actualmente, únicamente *Brucella* es de notificación obligatoria, y los animales son vacunados contra las enfermedades infecciosas abortivas tales como; Rinotraqueitis Infecciosa Bovina, Diarrea Viral Bovina, *Leptospira spp* y Parainfluenza3.

1. Marco Conceptual

La Neosporosis es una enfermedad parasitaria causada por *Neospora caninum*, un protozooario Apicomplexa intracelular obligatorio. Hacia el año de 1984 fue descrito por primera vez en un perro de Noruega (Bjerkås *et al.*, 1984). En 1988, Dubey reconoció este parásito como nueva especie después de encontrar taquizoitos predominantes en cerebro y cordón espinal de perros. Adicionalmente, realizó la prueba de inmunoperoxidasa con suero anti-*Toxoplasma gondii* y no se observó ninguna reacción (Dubey *et al.*, 1988a).

Esta patología, genera gran impacto tanto en el ámbito productivo como reproductivo en el ganado bovino, por la presentación de abortos, momificaciones fetales, muerte neonatal, nacimiento de crías débiles con sintomatología o sin sintomatología. Así como, baja producción de leche, aumento de días abiertos, repeticiones y descarte de animales de la ganadería. Neosporosis Bovina genera problemas representados en cuantiosas pérdidas económicas tanto en ganado lechero como en cárnico (Rodríguez *et al.*, 2016; Campero *et al.*, 2015; Motta *et al.*, 2014).

Por su parte, el ciclo de vida de *N. caninum*, se caracteriza por tener un hospedador definitivo carnívoro, tal como perros, coyotes, dingos y lobos, siendo el perro el más frecuente (Wilson *et al.*, 2016). Este hospedador cumple un papel importante en la transmisión horizontal, ya que libera mediante los excrementos estadios infectivos al ambiente, que son consumidos por los bovinos (Klauck *et al.*, 2016), los cuales infectan a sus crías, llevándose a cabo la transmisión vertical. Con relación a lo anterior, se ha encontrado que en la transmisión vertical o transplacentaria hasta el 100% de las crías nacen infectadas con este parásito (Wilson *et al.*, 2016; Pessoa *et al.*, 2016; Klauck *et al.*, 2016; Kamali *et al.*, 2014).

Existen otros géneros de *Neospora* como *hughesi* el cual afecta a caballos, ocasionando problemas de tipo neuromuscular. Hacia el año 2012, Reid *et al.*, estudiaron y compararon las estructuras de *Toxoplasma* y *Neospora caninum* Liverpool, encontrando similitudes

morfológicas, sin embargo, se evidenció variabilidad en gran parte del genoma y en las proteínas de superficie.

1.1. Morfología de *Neospora caninum*.

El parásito *Neospora caninum*, posee estadios de taquizoitos, bradizoitos, quistes tisulares, ooquistes no esporulados estos últimos se encuentran en el hospedador definitivo que al eliminarse pasar al estado infectivo. *Neospora* al ser una Apicomplexa, posee estructuras como conoide, que se encarga de sostener el citoesqueleto microtubular del parásito, también posee los apicoplastos, plastido no fotosintético encerrado por 4 membranas. Poseen micronemas que producen proteínas MIC implicadas en el reconocimiento y adhesión a célula hospedadora. Las roptrias se encargan de producir proteínas ROP que impulsan del parásito a la célula hospedadora. Los gránulos densos producen proteínas GRA que son importantes en la maduración de la vacuola parasitófora donde los parásitos se multiplican. Por su parte, como en otras células, las Apicomplexa también poseen compartimentos necesarios para la síntesis de proteína y transporte, incluyendo un núcleo, retículo endoplasmático rugoso que continúa a la envoltura nuclear, aparato de Golgi y mitocondria. En los bradizoitos, el núcleo está más hacia el lado posterior comparado con los taquizoitos. El quiste tisular contiene entre 50 a 200 bradizoitos, posee una pared (Jardine 1996; Dubey *et al.*, 2017)

Las fases de taquizoitos y bradizoitos ocurren en el hospedador infectado, y los esporozoitos son eliminados a través de la materia fecal del hospedador definitivo. Los taquizoitos tienen forma de media luna, miden aproximadamente 2 por 6 micras, tiene un núcleo medial central y son ausentes de gránulos de amilopectina, se caracterizan por tener una división rápida dentro de las células, y pueden infectar células neuronales, renales, endoteliales, miocitos, hepatocitos, macrófagos alveolares y trofoblastos de placenta. Por su parte, los bradizoitos son de replicación lenta en su estado de enquistamiento, así pues, forman un quiste tisular, el cual puede variar de tamaño dependiendo del número de

bradizoitos que contenga en su interior. Se ha encontrado que en perros un quiste tisular puede medir alrededor de 107 micras de diámetro y posee una pared de 4 micras de ancho. Además, en fetos bovinos el quiste tisular se encuentra en cerebro, médula espinal y mide 50 micras de diámetro con una pared de 2.5 micras de grosor. Los bradizoitos adicionalmente poseen un núcleo localizado, contienen pocos gránulos de amilopectina. Se considera que *N. caninum* persiste en el estado de bradizoitos en tejidos de vacas adultas. Así pues, los estadios de bradizoitos y taquizoitos pueden distinguirse por medio de la prueba de inmunohistoquímica. Finalmente, el ooquiste se caracteriza por medir 10 por 12 micras, son excretados por medio de la materia fecal de perros, la esporulación ocurre cuando cada ooquiste contenga dos esporoquistes y cada uno de estos contenga a su vez 2 esporozoitos (Jardine, 1995; Dubey *et al.*, 2017).

1.2. Ciclo de vida y transmisión.

La Neosporosis Bovina posee un ciclo de vida heteroxeno (Figura 1) (Ghalmi *et al.*, 2012). En donde el bovino, como hospedador intermediario consume ooquistes esporulados infectivos presentes en el pasto, alimento o agua de bebida (Klauck *et al.*, 2016). Entonces, se lleva a cabo la fase asexual donde se desarrollan los estadios de taquizoitos y bradizoitos. Cuando se presenta una inmunosupresión los bradizoitos son liberados presentándose una activación de la enfermedad (Klauck *et al.*, 2016; López *et al.*, 2007). Adicionalmente, los quistes tisulares y taquizoitos pueden afectar al feto vía transplacentaria (Vargas y Cortés, 2001). Durante la preñez, se presenta un aumento en la respuesta inmune con el fin de combatir el parásito, en este proceso T helper 2 produce la activación de varias citoquinas como; Interleuquina 2, Factor de Necrosis Tumoral (TNF) e Interferón gamma (IFN – gamma), además de la producción de Inmunoglobulina IgG 2. Asimismo, esta respuesta puede afectar la implantación fetal en etapas tempranas de la gestación, ocasionando aborto (Hecker *et al.*, 2015). Lo anterior da origen a una transmisión vertical o transplacentaria endógena. Sin

embargo, el consumo de ooquistes esporulados en las etapas tardías de la preñez, las crías infectadas nacen sin o con sintomatología, determinada por una transmisión transplacentaria exógena. Estudios reportan que en la transmisión transplacentaria hasta el 100% de las crías nacen seropositivas a *N. caninum* (Pessoa *et al.*, 2016; Kamali *et al.*, 2014; López *et al.*, 2007).

La fase sexual de *N. caninum* se lleva a cabo en el canino como hospedador definitivo e inicia cuando consume un feto bovino abortado contaminado con el parásito (Klauck *et al.*, 2016). Luego, el canino excreta los ooquistes al ambiente, los cuales esporulan aproximadamente en los 3 días siguientes, convirtiéndose en infectivos, estos ooquistes poseen dos esporoquistes y 4 esporozoitos (Vargas y Cortés, 2001). Finalmente, se inicia la transmisión horizontal cuando estas fases infectivas son ingeridas por los bovinos. Se ha detectado la presencia de *Neospora caninum* en animales silvestres, aves, caballos, ovejas, búfalos.

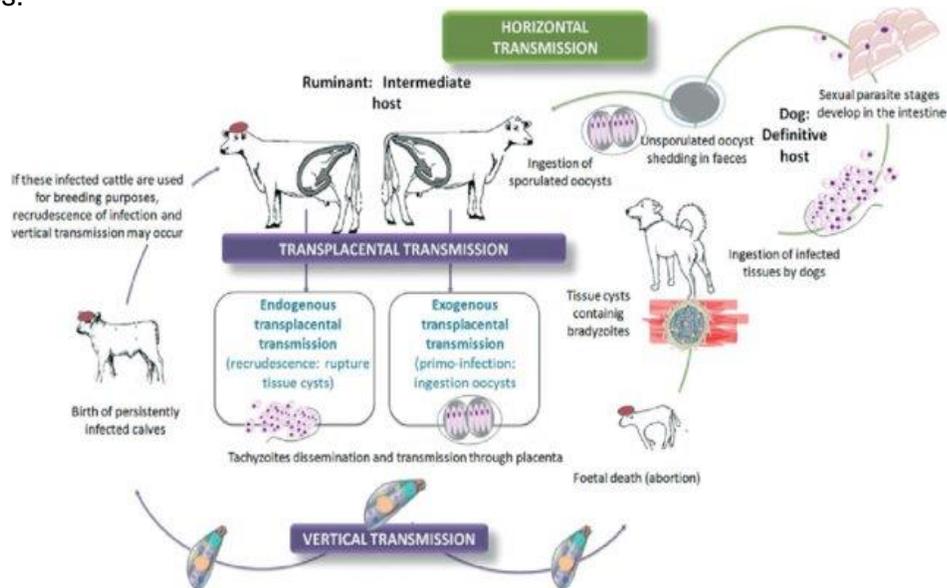


Figura 1. Ciclo de vida y transmisión de *Neospora caninum* (Benavides, *et al.*, 2014)

1.3. Signos clínicos

El aborto es uno de los signos de mayor presentación de la Neosporosis Bovina. Por un lado, se estima que la mayor ocurrencia de abortos está entre el cuarto y sexto mes de la gestación (Pessoa *et al.*, 2016; Kamali *et al.*, 2014; López *et al.*, 2007; Zambrano *et al.*, 2001). Pero, pueden existir otras complicaciones durante la gestación como: momificaciones fetales, reabsorciones fetales e inclusive repetición de abortos. Sin embargo, si el ternero nace puede manifestar sintomatología en aproximadamente los 5 días posparto (Vargas y Cortés, 2001). El caso contrario, el ternero puede nacer sin sintomatología, pero con presencia del parásito, llevando así a la diseminación de la enfermedad por varias generaciones. Así pues, los terneros que nacen manifiestan problemas a nivel neuromuscular, como ataxia, parálisis y reflejos disminuidos (Wilson *et al.*; 2016; López *et al.*, 2007; Vargas y Cortés, 2001).

1.4. Estudios de *Neospora caninum* en el ámbito internacional.

En los últimos años, se han reportado estudios de seroprevalencia en países como Argentina, Brasil, Canadá, Eslovaquia e Irán. En Argentina, Canadá y Brasil, se implementó la técnica de IFI indirecta, encontrando prevalencias de aproximadamente 9,7 %, 18,5% y 24% respectivamente (Wilson *et al.*, 2016; Campero *et al.*, 2015; Pessoa *et al.*, 2015). Rodríguez *et al.*, 2016, realizaron la prueba de ELISA de Aidez – IgG, seguido de IFI indirecta, con el fin de diferenciar la infección crónica de la aguda, determinando que los bovinos en fase crónica tenían un nivel de aidez alto y difícilmente abortaban, por el contrario, los bovinos de fase aguda, su índice de aidez era bajo, lo que aumenta el riesgo de aborto. Es por esto, que los índices de aidez se han usado para observar la respuesta de anticuerpos contra *N. caninum* (Rodríguez *et al.*, 2016). En Irán y Eslovaquia se utilizó la técnica de ELISA indirecta, encontrándose prevalencias de 8,9% y 28,1% respectivamente (Špilovská *et al.*, 2015; Nayebzadeh *et al.*, 2014). En Brasil, Eslovaquia y Canadá se presentaron abortos, por lo cual se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para su respectivo análisis, encontrando una mayor afectación en Sistema Nervioso Central. Wilson *et al.*, 2016 realizaron técnicas de histopatología, inmunohistoquímica y PCR. Este último, también fue elegida en Brasil y Eslovaquia, donde se presentaron abortos (Pessoa *et al.*, 2016; Špilovská *et al.*, 2015). Para Wilson *et al.*, 2016 la técnica de PCR proporciona una mayor especificidad, ya que es una buena alternativa para la identificación del parásito, pero en bovinos sin sintomatología, la presencia de *N. caninum* no quiere decir necesariamente que sea la causa del aborto (Wilson *et al.*, 2016). A pesar de no tener un diagnóstico en la presencia de abortos en estos estudios, se tuvo en cuenta las demás enfermedades que ocasionan aborto. Por ejemplo, en Argentina, los bovinos fueron vacunados contra virus y bacterias, previo a la realización del estudio (Rodríguez *et al.*, 2016), similar a Brasil, en donde se tenía un sistema de control para otras patologías reproductivas (Wilson *et al.*, 2016). En Canadá se implementó

la técnica de IFI indirecta, Seroneutralización, entre otras para descartar otras patologías que pudieran interferir con la búsqueda de *N. caninum* (Wilson *et al.*, 2016).

Pessoa *et al.*, 2016, determinaron que, en el estudio realizado, algunos de los bovinos seropositivos sufrieron otras complicaciones como retención de placenta, metritis, y hasta una disminución en la producción de leche.

1.5. *Neospora caninum* en Colombia.

En Colombia el primer reporte que se realizó fue en el 2001, donde Zambrano *et al.*, reportan 54% de sueros positivos a *N. caninum* de 357 animales muestreados, bajo la técnica de ELISA. Dos años más tarde en Sotaquirá, Boyacá se encontró una prevalencia del 15,9% en vacas Holstein de 88 animales (Andrade *et al.*, 2003) posteriormente, Andrade *et al.*, 2007 en Toca Boyacá hallaron que el 73% de las vacas eran positivas de 51 animales, estos estudios se realizaron utilizando la técnica de ELISA indirecta (Andrade *et al.*, 2007). Medellín *et al.*, en el 2017 evaluaron anticuerpo contra *N. caninum* con variables como tipo de inseminación, presentación de abortos, distocias, muerte embrionaria, repetición de celo, presentación de terneros nacidos débiles, únicamente se evidenció una relación con la presentación de distocia, relación con la edad del bovino y la raza. Se encontró la seroprevalencia de 45% de un total de 1000 animales analizados (Medellín *et al.*, 2017). Hacia el año 2007, en Fredonia Antioquia se encontró que el 39,9 % de los bovinos Holstein y el 2,0% de la raza Brangus, presentaban seropositividad a *N. caninum* de un total de 347 muestras (López, *et al.*, 2007). En el mismo año, Oviedo *et al.*, 2007 desarrollaron un estudio donde encontraron que el 10,2% de seropositividad, de estos bovinos seropositivos el 10,76% fueron casos de abortos, y un 9,7% vacas repetidoras, fueron analizados un total de 196 animales. En el 2016, Chaparro *et al.*, mediante la prueba de ELISA indirecta, evidenciaron una seroprevalencia de hasta el 37.1% en bovinos de ganado lechero pertenecientes a 29 hatos de la región norte de Antioquia, de 1003 animales muestreados. En el 2018, Llano, *et al.*, encontraron anticuerpos contra *N. caninum* en el 28,3% de los animales estudiados, pertenecientes a 1038 animales de 31 fincas del oeste Antioqueño, mediante la implementación de la técnica de ELISA indirecta. En Pasto Nariño, en el año 2013 se realizó un estudio utilizando la técnica de ELISA indirecta y ELISA para determinar anticuerpos IgG en los animales negativos a la ELISA indirecta, con el fin de dar un mejor resultado (Cedeño & Benavides, 2013). En este estudio se determinó una prevalencia de hasta el 76,9%, también se presentó el 2% de abortos de un total de 238 animales estudiados. En el Valle del Cesar

se evidenció un 89% de 300 animales muestreados (Peña, *et al.*, 2012). En el 2015 en el departamento, del Córdoba se analizaron muestras de suero de 162 bovinos, 28 caninos que provenían de 28 fincas, se evaluaron sintomatología y antecedentes de las fincas, así como los niveles de *Sarcocystina*. En 1995, Azumendi *et al.*, determinaron la presencia de una toxina presente en *Neospora caninum* que puede reactivar la enfermedad en bovinos adultos sometidos a factores de estrés, con base en lo anterior se encontraron tanto prevalencias hasta del 74.7 % como presencia de la toxina hasta 151 UI/L (Cardona *et al.*, 2015). En Sugamuxi Boyacá usaron ELISA indirecta evidenciaron una prevalencia de 57,5% en bovinos de leche de 400 animales en total estudiados (Medellín *et al.*, 2013). Otro de los estudios realizados, fue en el Departamento del Caquetá donde los datos de prevalencia de anticuerpos fueron de 12,5% provenientes de 7 predios, utilizando la prueba de ELISA indirecta (Motta *et al.*, 2014). Además de ELISA, se han implementado técnicas como IFI indirecta, como en Sopó Cundinamarca, donde arrojó una prevalencia de 21,26% de un total de 397 animales analizados (García-Chaparro, *et al.*, 2014) y en Oicatá Boyacá, se encontró una prevalencia de 2,8% de 228 animales estudiados (Carrillo *et al.*, 2014). Oviedo *et al.*, estudiaron 108 fetos mayores de 5 meses, de los cuales en el 27,8% se observaron lesiones compatibles con la presencia de *N. caninum* (Oviedo *et al.*, 2008) (tabla 2).

Tabla 1. Estudios de *Neospora caninum* en Colombia.

Estudio	Departamento	Técnica usada	Número de animales	Seroprevalencias
Zambrano <i>et al.</i> , 2001	Cundinamarca	ELISA	357	54%
Andrade, <i>et al.</i> , 2003	Boyacá	ELISA Indirecta	88	15,9%
Andrade, <i>et al.</i> , 2007	Boyacá	ELISA Indirecta	51	73%
López, <i>et al.</i> , 2007	Antioquia	ELISA	347	39,9% Holstein 2% Brangus
Oviedo <i>et al.</i> , 2007	Córdoba	ELISA	196	10,2%
Oviedo <i>et al.</i> , 2008	Córdoba	Histopatología	108 fetos	27,8
Peña, <i>et al.</i> , 2012	Cesar	ELISA Indirecta	300	89%
Cedeño & Benavides, 2013	Pasto	ELISA Indirecta	238	76,9%,
Medellín <i>et al.</i> , 2013	Boyacá	ELISA indirecta	400	57.7%
Carrillo <i>et al.</i> , 2014	Boyacá	IFI indirecta	228	2,8%
García-Chaparro, <i>et al.</i> , 2014	Cundinamarca	IFI indirecta	397	21.26%
Motta, <i>et a.</i> , 2014	Caquetá	ELISA indirecta	7 predios	12,5%
Cardona <i>at al.</i> , 2015	Córdoba	ELISA Indirecta	162 bovinos, 28 caninos	74.7%, 50%
Chaparro <i>et al.</i> , 2016	Antioquia	ELISA Indirecta	1003	37.7
Medellín, <i>et al.</i> , 2017	Boyacá	ELISA Indirecta	1000	45%
Llano, <i>et al.</i> , 2018	Antioquia	ELISA Indirecta	1038	28,3%

1.6. Bioensayos de *Neospora caninum*.

Dentro de los estudios sobre aislamiento se reportan los bioensayos utilizando ratones como BALB/c (Al-Qassab *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2014, Okeoma *et al.*, 2004, Walton, 2008), Gerbils, KO, entre otros. Este método de bioensayo es una herramienta utilizada para medir el grado de infectividad de los aislamientos de *Neospora caninum* (Al-Qassab *et al.*, 2010; Okeoma *et al.*, 2004). Estos animales de experimentación necesitan varias repeticiones de dosis de infección con *Neospora* para asegurar el estudio, se recomiendan alrededor de 2 inyecciones de 2 a 4 mg de *Neospora* al animal. Asimismo, se le administra acetato metilprednisolona (Dubey, 1992) seis días antes y el día cero de la inoculación con 10 o más taquizoitos. Por lo cual, el grado de infección ya sea aguda o crónica va a depender de las dosis administradas de corticoides y número de taquizoitos (Dubey, 1992). Los animales son inoculados bien sea vía subcutánea o intraperitoneal con tejido cerebral de bovino o canino infectado con *Neospora caninum* y sometido a digestión artificial (GoŹdzik & Cabaj, 2007), seguido de la inoculación y manifestación de síntomas de Neosporosis como hepatitis, encefalomiелitis y neumonía (Dubey, 1992). Al igual que se ha hecho con los caninos y bovinos, el cerebro de los ratones infectados es cultivado y analizado bajo técnicas de diagnóstico como histopatología e inmunohistoquímica.

1.7. Ensayos de aislamiento y caracterización de *Neospora caninum* en cultivos celulares.

El primer aislamiento *in vitro* de *N. caninum* reportado fue realizado por Dubey *et al.*, 1988, quienes cultivaron inicialmente el protozoario en monocitos y células endoteliales de aorta pulmonar, posteriormente, estos fueron utilizados para infección experimental en caninos (Dubey, 1992). A partir de ese momento hasta la fecha se han conseguido diversidad de aislamientos *in vitro* en países como Australia, Estados Unidos, España, China (Hao *et al.*, 2014), Corea (Kim *et al.*, 2000), Italia, Japón, Nueva Zelanda, Suecia (Stenlund *et al.*, 1997) Suiza y países de Latinoamérica como Brasil (Locatelli-Dittrich *et al.*, 2004) (Gráfica 2) y Argentina (Campero *et al.*, 2015). Dicho lo anterior, el aislamiento del parásito se realiza a partir de tejido cerebral infectado con *N. caninum* bien sea de fetos abortados, terneros nacidos débiles hasta terneros infectados congénitamente sin sintomatología. Estos cerebros son extraídos asépticamente en el momento de la necropsia, una mitad es fijada en formol bufferado para su respectiva histopatología e inmunohistoquímica (Conrad *et al.*, 1993; Yamane *et al.*, 1997). Por consiguiente, la otra mitad es sometida al proceso de digestión artificial y procedimientos de filtración para luego ser inoculados en cultivos celulares. Dentro de los cultivos celulares que van a ser infectados con *N. caninum* se encuentran las células endoteliales de aorta pulmonar bovina, células cerebrales de bovino, así como células de duodeno canino (Hemphill *et al.*, 2009) y las líneas de células Vero, estas últimas son las más utilizadas en los estudios de aislamiento de *N. caninum*. (Yamane *et al.*, 1997). Los protocolos de cultivos celulares para dichos estudios se utilizado bien sea MEM o RMPI como medios de cultivo, con la adición de fármacos como Penicilina, Gentamicina, Anfotericina para prevenir contaminación bacteriana o fúngica de los cultivos. Adicionalmente, en cuanto a factores de crecimiento celular se puede utilizar Suero Fetal Bovino o Suero de Equino Adulto (Conrad *et al.*, 1993; Yamane *et al.*, 1997; GoŹdzik & Cabaj, 2007). En los cultivos celulares es posible obtener la fase de bradizoitos utilizando óxido nítrico como factor de estrés, lo cual induce de la fase taquizoitos a bradizoitos (Al- Qassab *et al.*, 2010).

En el 2011, en España evaluaron la proliferación y la eficiencia de invasión de *Neospora caninum* en cultivos de líneas celulares para comprender su virulencia. Así pues, analizaron 10 aislamientos de aisladas en España y una en Inglaterra, estas fueron aisladas en células de riñón de mono MARC -145, se analizó el proceso de internalización de los taquizoitos a las células en un intervalo de 2, 4 y 6 horas pos-inoculación. Se observó una variabilidad en la fase exponencial, por lo cual la capacidad de proliferación difiere entre los aislamientos. Para este estudio se realizaron aislamiento en las líneas celulares, posteriormente bioensayos y purificación de taquizoitos (Regidor-Cerrillo *et al.*, 2011).

En la actualidad se reportan alrededor de 20 a 25 aislamientos de *Neospora caninum* a nivel mundial a partir de fetos abortados o terneros nacidos. Los primeros métodos de caracterización consistían en comparar la presencia de anticuerpo de *Neospora* ya aislados en otros países con nuevos aislamientos, bajo la técnica de Inmunofluorescencia (Al-Qassab *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2014, Okeoma *et al.*, 2004; Walton, 2008), adicionalmente, esta técnica se utiliza en el año 2000 para medir la reactividad con otros aislamientos de *N. caninum* y otros antígenos como Toxoplasma (Hao *et al.*, 2014). Años más tarde, estudios de aislamiento implementaron otras técnicas tales como; microsátélites (Al-Qassab *et al.*, 2010; Hao, *et al.*, 2014; Campero *et al.*, 2015), gen Nc5 (Hao *et al.*, 2014), pequeña subunidad ribosomal (Hao *et al.*, 2014), PCRs (Hao *et al.*, 2014; Campero *et al.*, 2015). Nueva Zelanda (Okeoma *et al.*, 2004), secuenciación y pruebas serológicas como apoyo en la caracterización del parásito. Dentro de los países en los cuales se han hecho aislamiento *in vitro* se encuentra Australia, Brasil, Corea, Estados Unidos, España, Japón, Nueva Zelanda y Suiza. Como parte de la caracterización se han utilizado los primers Np 6 y Np21 (Campero *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2007). Por su parte, se reporta la secuenciación de la cepa de *Neospora Liverpool* de Inglaterra por medio de SANGER (Reid, *et al.*, 2012).

Según Tibayrenc y Ayala, 2012 al obtener microorganismos clonales, se tiene menos riesgo de heterogeneidad. Además, el uso de clones permite el estudio filogenético de microorganismos, estudio de marcadores, polimorfismos. Así pues, se evita la variabilidad genética propias de aislamientos naturales, más si se considera que de acuerdo con Pérez-Zaballos *et al.*, 2005, *N. caninum* tiene capacidad de reproducción asexual durante su estadio

en el hospedador definitivo, lo que puede originar importante variabilidad genética en los inóculos con que se infectan los hospedadores intermediarios.

2. Metodología

2.1. Criterios de inclusión y exclusión para el estudio de *Neospora caninum*

Para este estudio se seleccionaron: fetos abortados, muestras de cerebro, pulmón, riñón, hígado, corazón, placenta y bazo provenientes de fetos abortados, terneros y vacas adultas con sintomatología nerviosa (Tabla 2). Se excluyeron muestras remitidas en un tiempo mayor a 24 horas de la toma sin una adecuada conservación. Todos los especímenes del estudio fueron casos remitidos al laboratorio de la Fundación Colombiana de parásitos provenientes de fincas con problemas reproductivos durante los meses de mayo a diciembre del 2017.

Se analizaron tres fincas del departamento de Cundinamarca y una finca del departamento del Cesar. Para su estudio se tuvo en cuenta los antecedentes y sintomatología la vaca que aborto, número de partos. Además, se tomaron datos como fecha de la presentación de aborto, edad del feto abortado, presencia de retención placentaria y vacunación.

Tabla 2. Muestras seleccionadas para el estudio.

Identificación de la muestra	Espécimen	Región proveniente	*Método de conservación
010517-12	Feto abortado 2 meses	Cesar	Refrigerado
020517-15	Feto abortado 7 meses	Cundinamarca	Refrigerado
010617-16	Feto abortado 6 meses	Cundinamarca	Refrigerado
010817-18	Feto abortado 7 meses	Cundinamarca	Refrigerado
010917-19	Feto abortado 6 meses	Cundinamarca	Refrigerado
011217-20	Feto abortado 3 meses	Cundinamarca	Refrigerado
10417-11	Ternero	Cesar	Tejidos formol bufferado
10517-14	Ternero	Cesar	Tejidos formol bufferado
10517-15	Vaca adulta	Cesar	Tejidos formol bufferado
20917-7	Placenta	Cundinamarca	Tejido refrigerado

*Las muestras refrigeradas fueron almacenadas en un tiempo menor a 24 horas.

2.2. Evaluación de lesiones macroscópicas y microscópicas.

Se realizó como parte del protocolo para la identificación de *Neospora caninum*, la necropsia e histopatología a fetos abortados, fueron tomadas secciones de riñón, pulmón, corazón, bazo, hígado, placenta y uno de los hemisferios del cerebro, estos tejidos se almacenaron en formalina bufferado, luego fueron parafinados, cortados, fijados en láminas y teñidos con hematoxilina-eosina. Se realizó al menos 5 cortes de cerebro para cada una de las muestras de fetos bovinos abortados.

2.3. Detección Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en cerebros y placenta

Se implementó la técnica de inmunohistoquímica a secciones de tejidos de cerebro fijados en láminas y una muestra de placenta y bajo el proceso de desparafinación, adicionalmente, se tomaron de cada cerebro de feto abortado al menos cinco cortes. Así mismo, fue realizada a muestras de citología directamente del cerebro y sometido a digestión artificial. El procedimiento se realizó de acuerdo con las especificaciones de Vectastain ABC-HRP kit (peroxidase, Goat IgG) Catalog Number: PK-4005 (Vector Laboratories), como anticuerpo de utilizará PAB-NC Anti-*Neospora caninum* Antiserum, Catalog 210-70-NC (VMRD) de acuerdo con las especificaciones del fabricante y finalmente como sustrato 3-amino -9-etilcarbazol Marca DAKO, la información de su uso se obtuvo de las especificaciones del producto.

2.4. Obtención de *Neospora caninum* a partir de cerebro de feto abortado

Para la obtención de *Neospora caninum* se realizó el proceso de digestión artificial de cada una de las muestras de cerebro de feto bovino abortado, se tomó como base el protocolo descrito por GoŹdzik & Cabaj, 2007. Se realizó la separación de *N. caninum* por gradientes de densidad usando Percoll, en base al protocolo reportado por McGuire, *et al.*, 1997.

2.5. Evaluación de efecto citopático y expansión del aislamiento clonal en la línea celular Vero

Como línea celular, fueron utilizadas las células Vero 8141, adquiridas en el laboratorio de Farmacogenética del Cáncer del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, a cargo del profesor Fabio Aristizábal. Para el cultivo celular se utilizó el medio mínimo esencial MEM con glutamina (GIBCO), gentamicina (34 microlitros/ 50 ml de MEM) y suero fetal bovino al 10%, a 37°C con 5% de CO₂.

Para el proceso de expansión clonal, de las fases parasitarias obtenidas, se tomó de uno a dos quistes tisulares obtenidos del proceso de digestión y fueron sembrados en cultivos de células Vero en matraces de 25 T. Las muestras fueron incubadas a 37 grados centígrados, con CO al 5% por 72 horas.

2.5.1. Evaluación inmunocitoquímica de células vero-infectadas.

Posterior a la infección de las células Vero, se tomaron aproximadamente 100 microlitros del sobrenadante y fueron realizadas citologías por triplicado para la implementación de la prueba de inmunocitoquímica.

2.6. Detección molecular

2.6.1. Evaluación de métodos de extracción de DNA y cuantificación de producto de extracción.

Se realizó tripsinización para extraer toda la muestra incluyendo células que se encuentren adheridas. Las muestras se centrifugaron a 1700 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante. Posteriormente, el sedimento fue lavado dos veces con buffer PBS estéril pH 7,5. Seguidamente, el sedimento fue re suspendido en 2 ml de PBS estéril. Separado por la técnica de Percoll (McGuire, *et al.*, 1997).

Se implementaron varias técnicas de extracción de DNA con purificación como la descrita por Dubey, *et al.*, 2017, mediante el uso de buffer de lisis con proteinasa K (20mg/ml) a una temperatura de incubación de 37 grados centígrados y purificación con fenol-cloroformo-Alcohol isoamílico y a una temperatura de 55 grados (Leineweber, *et al.*, 2017) centígrados y los tiempos de 2 hasta 20 horas, así como cambios en las concentraciones de proteinasa k de 20 mg/ml y 10 mg/ ml y las cantidades de proteinasa k que variaba desde 6,25 microlitros hasta 12 microlitros y 2 microlitros de ARNasa.

Se realizó el protocolo de extracción implementado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, utilizando CTAB 2% con y sin proteinasa K, y purificación de la muestra

con cloroformo- alcohol isoamílico, en este procedimiento se utilizó la técnica de disrupción mecánica utilizando en diferentes ensayos de bead beating : perlas de zirconio de 2mm, 1 mm y arenilla de vidrio de 0,1 mm, a esto se adicionaron ciclos de congelación y descongelación a temperaturas extremas con el fin de facilitar el rompimiento de las membranas de los parásitos. Se realizó la cuantificación por fluorometría (Fluorometer Qubit TM Invitrogen) y electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, a 100 voltios durante 30 minutos.

Tabla 3. Métodos de extracción de DNA de *Neospora caninum*

Protocolo	Purificación de la muestra	Reactivos	Temperatura	Tiempo
ruptura mecánica con arenilla vidrio estéril	no	no	ciclos congelación a -20 °C 24 horas y 11 ciclos de congelación y descongelación a 37°C	24 horas
Ruptura mecánica con perlas de zirconio estériles. disruptor 3 ciclos	no	buffer TE 1x	congelación a -20 /15 min y descongelación 37°C / 15 min	2 horas
Sonicación	no	Buffer PBS	-	1 hora
Calor	Cloroformo- alcohol isoamílico (protocolo IBUN)	MEM	100°C	15 minutos
Calor	no	MEM	100°C	15 minutos
Ruptura enzimática	Cloroformo- alcohol Isoamílico (protocolo IBUN)	500 microlitros Buffer de lisis + 100 microlitros proteinasa k (20mg/ml) (Dubey, et al., 2017)	37°C	1 hora
Ruptura enzimática	Cloroformo- alcohol Isoamílico (protocolo IBUN)	500 microlitros Buffer de lisis + 10 microlitros proteinasa k (20mg/ml) (Dubey, et al., 2017)	55°C	20 horas
Ruptura enzimática + disrupción 3 ciclos	Fenol -Cloroformo- alcohol Isoamílico	500 microlitros Buffer de lisis (Dubey, et al., 2017) + 10 microlitros proteinasa k (20mg/ml)	37°C	12 hora
Ruptura enzimática + disrupción 3 ciclos	Cloroformo puro grado molecular	Buffer de lisis + proteinasa k (10mg/ml) (protocolo de Instituto de Genética de Universidad Nacional)	55°C	1 hora
Ruptura enzimática + disrupción 3 ciclos	Cloroformo puro grado molecular	300 microlitros Buffer CTAB 2% + proteinasa k (20mg/ml)	57°C	1 hora
Ruptura enzimática + disrupción 4 ciclos	Fenol -Cloroformo- alcohol Isoamílico	Buffer de lisis (protocolo de Instituto de Genética de Universidad Nacional) + RNAsa	55°C	12 hora

2.6.2. Aplicación de la técnica PCR Convencional en productos de extracción.

Se realizó PCR convencional siguiendo lo descrito por Regidor-Cerrillo, *et al.*, 2006. Se utilizó kit de PCR de Boline.

2.6.3. Implementación de la técnica de PCR en Tiempo Real en células Vero-infectadas.

Se utilizó el kit LightCycler 480 SYBR Green I Máster de Roche. Por su parte, los primers utilizados fueron NP21 plus y NP6 Plus (Müller *et al.*, 1996), diseñados por Biosearch Technologies. El protocolo de PCR utilizado fue el descrito por Regidor-Cerrillo *et al.*, 2006.

2.6.4. Cuantificación de producto de PCR

Se realizó la cuantificación por fluorometría (Fluorometer Qubit TM Invitrogen) y electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, a 75 voltios durante 1 hora.

2.7. Identificación de polimorfismo

Fueron seleccionados 7 microsateélites; MS4, MS5, MS6A, MS7, MS8, MS10 y MS12 reportados por Regidor-Cerrillo *et al.*, 2013. Se realizó PCR convencional según, Regidor-Cerrillo *et al.*, 2006.

3. Resultados

Las fincas de Cundinamarca y Cesar eran fincas de explotación semi extensiva. Las vacas se encontraban desparasitadas y vacunadas contra Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueitis infecciosa Bovina, *Parainfluenza 3*, Serovares de *Leptospira* y Virus Sincitial Respiratorio Bovino, y *Brucella* de notificación obligatorio (Resolución 7231 de 2017 - ICA). Las fincas tenían antecedentes de abortos sin aparente sintomatología en la mayoría de los casos.

En el laboratorio de la Fundación Colombiana de Estudios de Parásitos, fueron evaluados 6 fetos entre los 2 a 7 meses, una placenta, y tejidos en formol bufferado de dos terneros que presentaron ataxia y convulsiones, y mueren días después. Del mismo modo, llegan tejidos en formol bufferado de una vaca adulta, la cual abortó y presentó sintomatología nerviosa, posteriormente muere.

3.1. Evaluación de lesiones macroscópicas y microscópicas

1. 010517-12

Se remitió feto abortado de dos meses de gestación. El aborto se presentó en el primer parto y no se reportó alguna sintomatología. En la necropsia se observó hemorragia subcutánea, hemotórax, hemoperitoneo, atriquia, los tejidos presentaron una consistencia friable. Los tejidos presentaron autolisis avanzada (figura 2).

En lesiones microscópicas se observaron los tejidos presentaron autolisis avanzada. En cerebro se observó congestión de vasos sanguíneos, hemorragia focal edema, gliosis y presencia de quistes tisulares (figura 3).



Figura 2 Necropsia de feto 010517-12. Feto de 2 meses. Presencia de hemotórax, hemorragias generalizadas y ausencia de pelo.

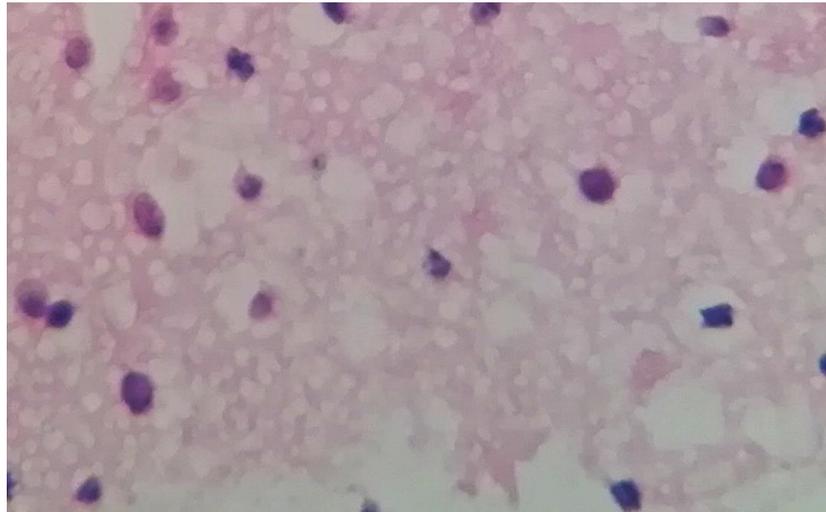


Figura 3. Histopatología de Cerebro de feto 010517-12. Cerebro de feto abortado, se observa presencia de edema, lisis celular, 40 X H&E.

2. 020517-15

Remitido feto abortado de 7 meses de gestación de una vaca de primer parto. En la necropsia se observó presencia de petequias, edema subcutáneo, hemotórax, hemoperitoneo, bazo aumentado de tamaño, hígado de consistencia friable, pulmones con hemorragias con distribución focal, en riñón friable y finalmente, corazón con hemorragia y edema en pericardio (Figura 4).

Fueron evaluados; miocardio, riñón, pulmón, bazo, hígado, cerebro, cerebelo y tallo encefálico, se hallaron lesiones microscópicas en cerebro, se observó vasos sanguíneos congestionados, edema perivascular. Los tejidos fueron morfológicamente normales (Figura 5).



Figura 4. Feto abortado 7 meses. Congestión y presencia de líquido sanguinolento en cavidades de tórax y peritoneo

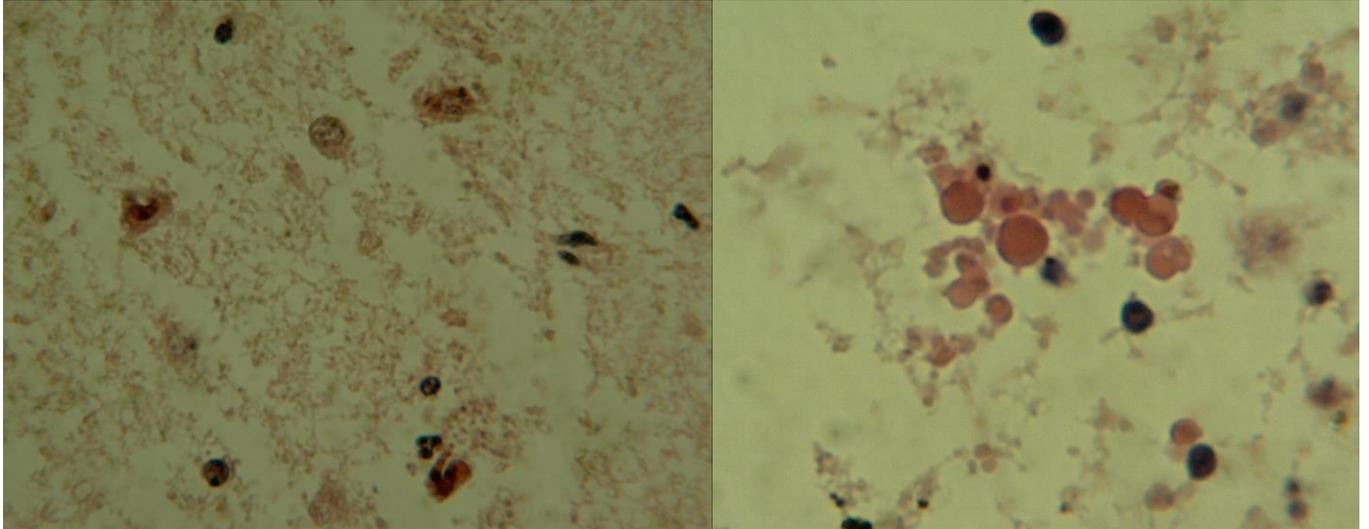


Figura 5. Histopatología de cerebro de feto 020517-15. A. presencia de lisis celular, 40x H&E. B. Hemorragia y lisis celular 100x, H&E.

3. 010617-16

Remitido al laboratorio FUNCEP, feto abortado de 6 meses. En la necropsia se observó presencia de líquido sanguinolento en cavidad torácica y peritoneal. Cerebro, pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón de consistencia friable y congestionadas, también se observó atriquia (Figura 6).

En los hallazgos microscópicos, se observó en las paredes de los alvéolos y en la luz de los pasajes aéreos exudado caracterizado por la infiltración de abundantes polimorfonucleares neutrófilos y algunas células plasmáticas. En cerebro se observaron vasos sanguíneos con distensión de la luz por congestión e hiperemia, y en la pared de algunos vasos, particularmente en la corteza cerebral presentó una ligera infiltración de linfocitos y gliosis de microglia que, aparentemente presento citoplasmas vacuolados que contenían gránulos – basófilos (Figura 7). En contraste, en el miocardio, riñón, bazo, hígado no presentaron lesiones microscópicas.



Figura 6. Feto bovino abortado 010617-16. Feto abortado de 6 meses. Presencia de líquido sanguinolento en cavidad torácica, se observó atriúquia.

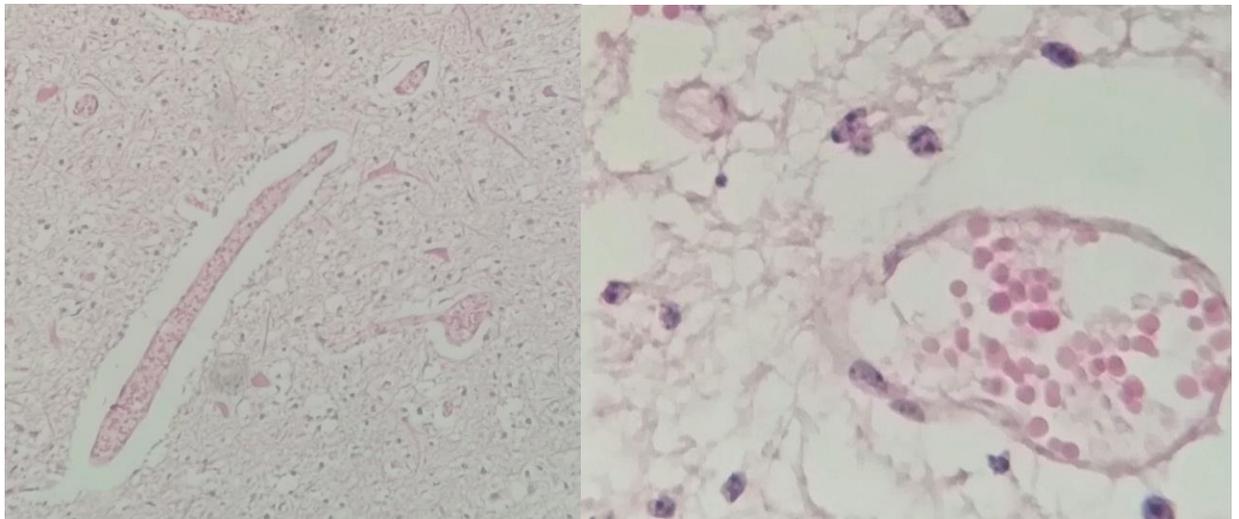


Figura 7. Histopatología de cerebro feto 010617-16. A. Congestión de vasos sanguíneos y edema perivascular, 40x, H&E. B. Congestión de vasos sanguíneos y lisis celular, 100x, H&E.

4. 010817-18

Feto abortado de 7 meses de gestación. En la evaluación macroscópica se observó congestión de órganos, edema subcutáneo, gran cantidad de líquido sanguinolento en cavidades (Figura 8).

En los resultados de microscopia, se evaluó tejido cerebral, encontrando congestión de vasos sanguíneos, edema y gliosis (figura 9). En los órganos pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón no se evidenció lesiones microscópicas.



Figura 8 Feto abortado 010817-18. Presencia de hemorragia y congestión generalizada.

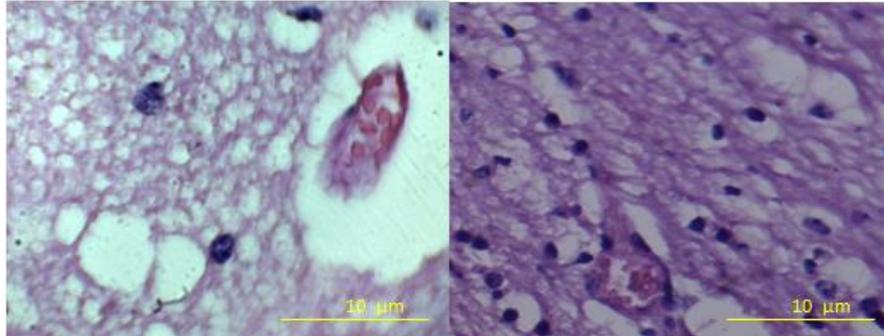


Figura 9. Resultado de histopatología de cerebro de feto 010817-18. A. Lisis celular, congestión y edema, 100x, H&E. B. congestión y edema 40x, H&E.

5. 010917-19

Se remitió al laboratorio un feto abortado de 6 meses. En la necropsia, observó atriquia, edema subcutáneo, pulmón, hígado, riñón, bazo y cerebro congestionados, presencia de hemotórax y hemoperitoneo (Figura 10).

En los hallazgos microscópicos, se observó procesos autolíticos en cerebro, corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón, en dichos órganos no se encontraron lesiones microscópicas a excepción del cerebro, en el cual se evidencio congestión de los vasos sanguíneos, edema y aparentemente gliosis.



Figura 10. Feto abortado de 6 meses. 010917-19. Presencia de líquido sanguinolento en cavidades, Atriquia y hemorragias subcutáneas.

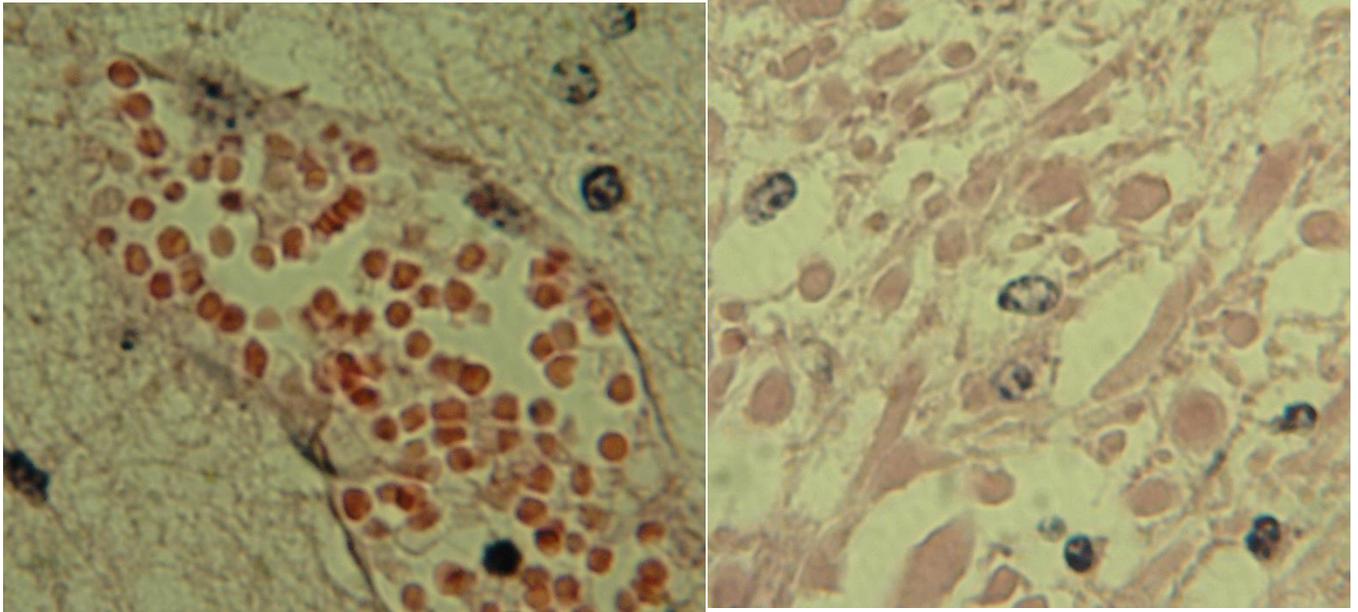


Figura 11. Cortes histopatología de cerebro 010917-19. A. Congestión de vasos sanguíneos, 100x, H&E. B. Edema y lisis celular.

6. 011217-20

Se remitió al laboratorio feto abortado de 3 meses. En la necropsia se observó atriquia, edema subcutáneo. Cavity torácica y peritoneal con presencia de líquido sanguinolento. Se observó cerebro, pulmón consistencia friable, hemopericardio, hígado aumentado de tamaño, esplenomegalia, riñón friable. Congestión generalizada (Figura 12).

Se observó que todos los tejidos evaluados presentaban autólisis, lo cual no permitió hallar lesiones microscópicas. Sin embargo, en cerebro se pudo observar congestión de vasos sanguíneos, edema perivascular, lisis celular y quistes tisulares (Figura 13).



Figura 12. Feto bovino abortado de 3 meses. Presencia de líquido sanguinolento en tórax y peritoneo. Atriquia y hemorragias subcutáneas.

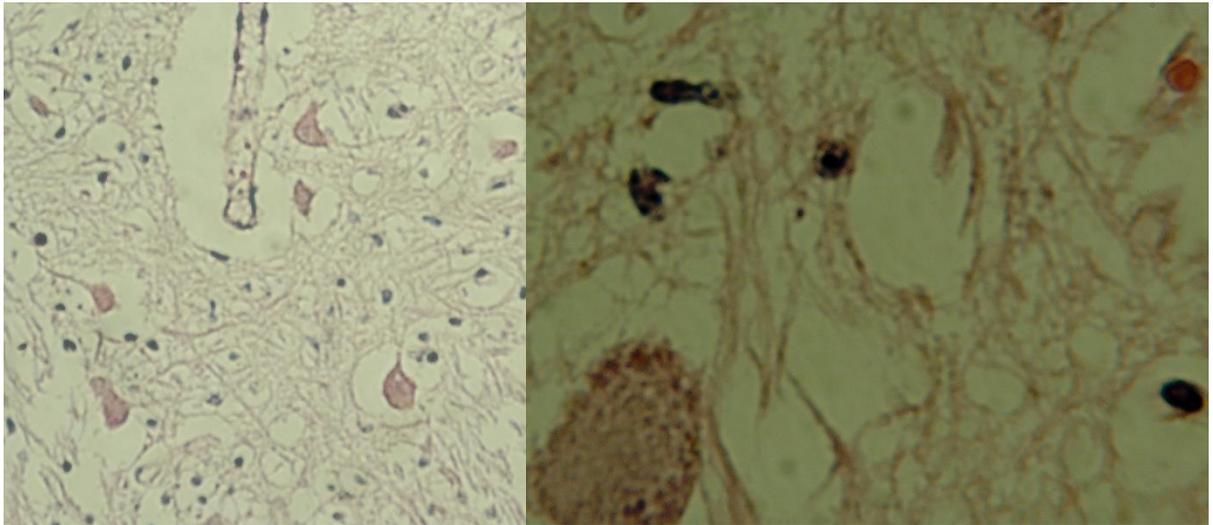


Figura 13. Resultados microscópicos feto abortado 011217-20. A. congestión de vasos sanguíneos, autólisis. B. presencia de quiste tisular, autólisis y hemorragia.

7. 10517-15

Se evalúan tejidos de vaca adulta que fallece días después de abortar un feto de 6 meses, presentó sintomatología nerviosa. No se evidenciaron lesiones microscópicas en corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón. En cerebro se observó congestión de vasos sanguíneos, edema, gliosis, presencia de células proinflamatorias (Figura 14).

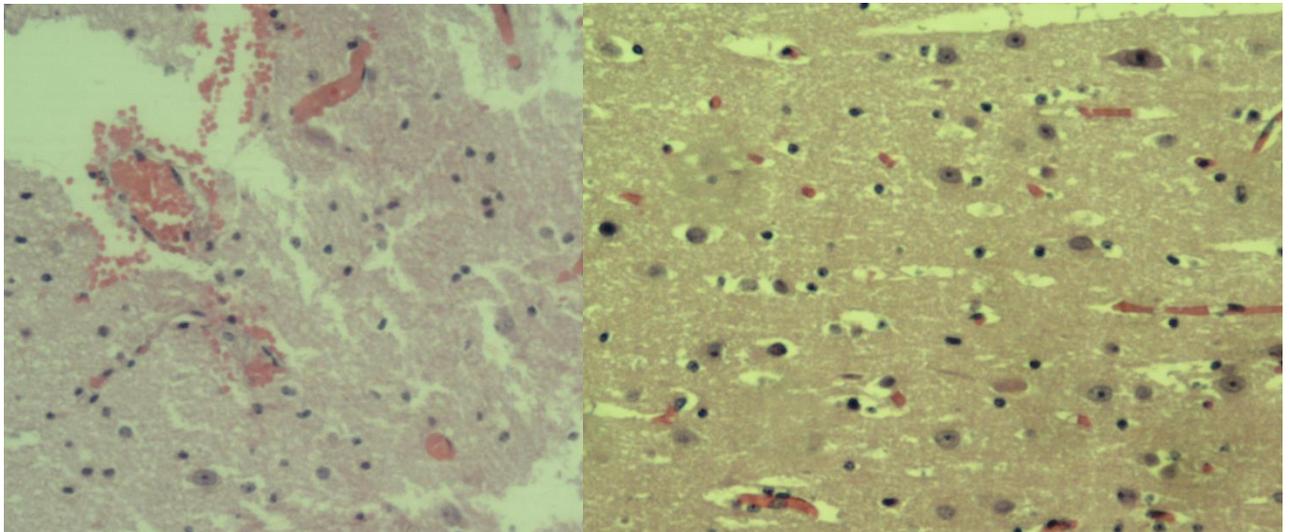


Figura 14. Resultados de hallazgos microscópicos de cerebro de vaca adulta 10517-15. A. congestión de vasos sanguíneos, hemorragia localizada, edema, lisis celular. 40x, H&E. B. congestión de vasos sanguíneos y gliosis, 40x, H&E.

8. 20917-7

Llega al laboratorio placenta de un feto abortado (Figura 15). Se examinaron diferentes cortes de placenta. Se observaron cambios autolíticos, sin embargo, se evidencian detritus celulares y regiones necróticas. Así mismo, se observó múltiples estructuras cocobacilos extracelular y dentro de macrófagos, por lo cual se realiza la coloración de Gram. Dichas estructuras eran de gran tamaño y fueron negativas a la coloración de Gram, posteriormente, se realizó la prueba de inmunohistoquímica.

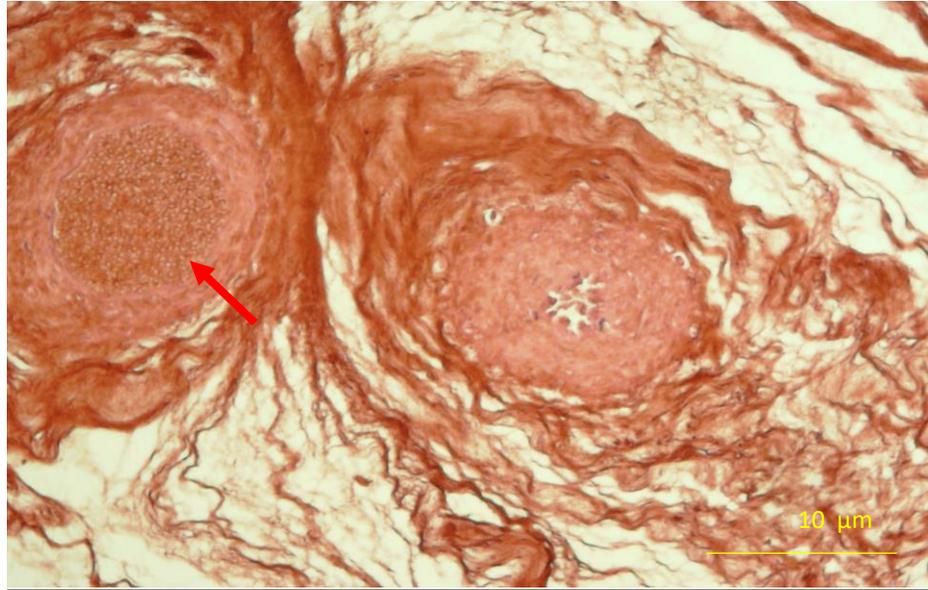


Figura 15. Resultado de hallazgos microscópicos de placenta de feto bovino abortado 20917-7. Autolisis, quiste tisular de *Neospora caninum* (flecha roja). 100x, H&E.

9. 10417-11

Llegó al laboratorio tejidos de ternero, que presentó ataxia, dificultad para incorporarse y convulsiones, días después muere. En los hallazgos microscópicos se observó en cerebro vasos sanguíneos congestionados, gliosis, edema, hemorragias y presencia de quistes tisulares (Figura 16).

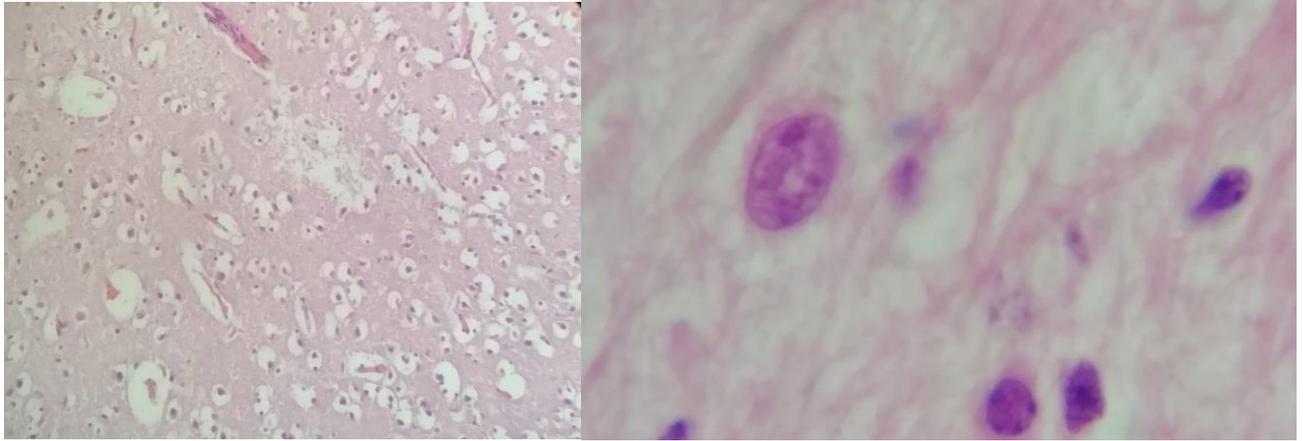


Figura 16. Resultados hallazgos microscópicos de cerebro ternero 10417-11. A. congestión de vasos sanguíneos, edema, 20x, H&E. B. Quiste tisular, autolisis, 100x, H&E.

10.10517-15

En mes de mayo del 2017, ternero que nace a término con dificultad para incorporarse y episodios de convulsión, muere días posteriores. En los hallazgos microscópicos, se evidenció en miocardio múltiples quistes de forma redondeada y oval en citoplasma de células cardíacas con presencia de granulación basófila, se identificó aproximadamente 17 parásitos por campo óptico de 100x. En cerebro se observa presencia de quistes tisulares de gran tamaño, además congestión de vasos sanguíneos y hemorragias focales (Figura 17)

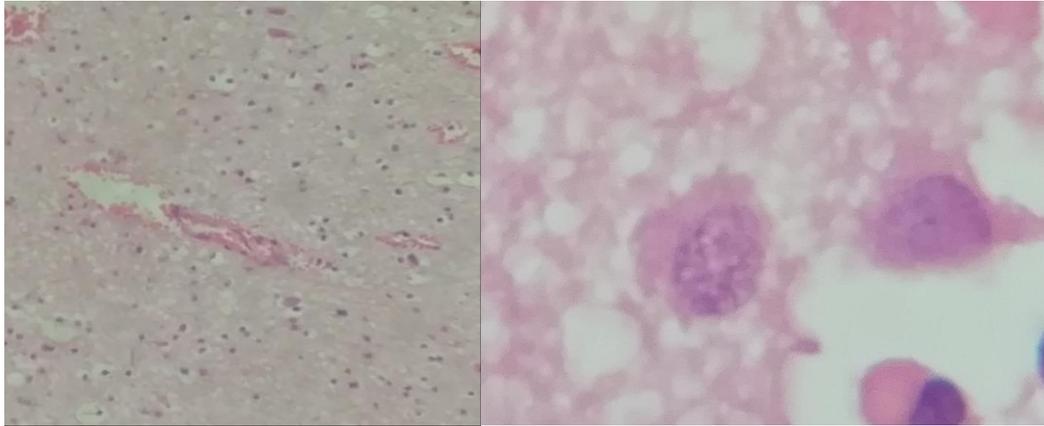


Figura 17. Resultados de hallazgos microscópicos de ternero 10517-15. A. congestión de vasos sanguíneos, edema, hemorragias focales., 20X, H&E. B. Quiste tisular, 100X, H&E.

3.2. Detección Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica en cerebros y placenta

1. 010517-12

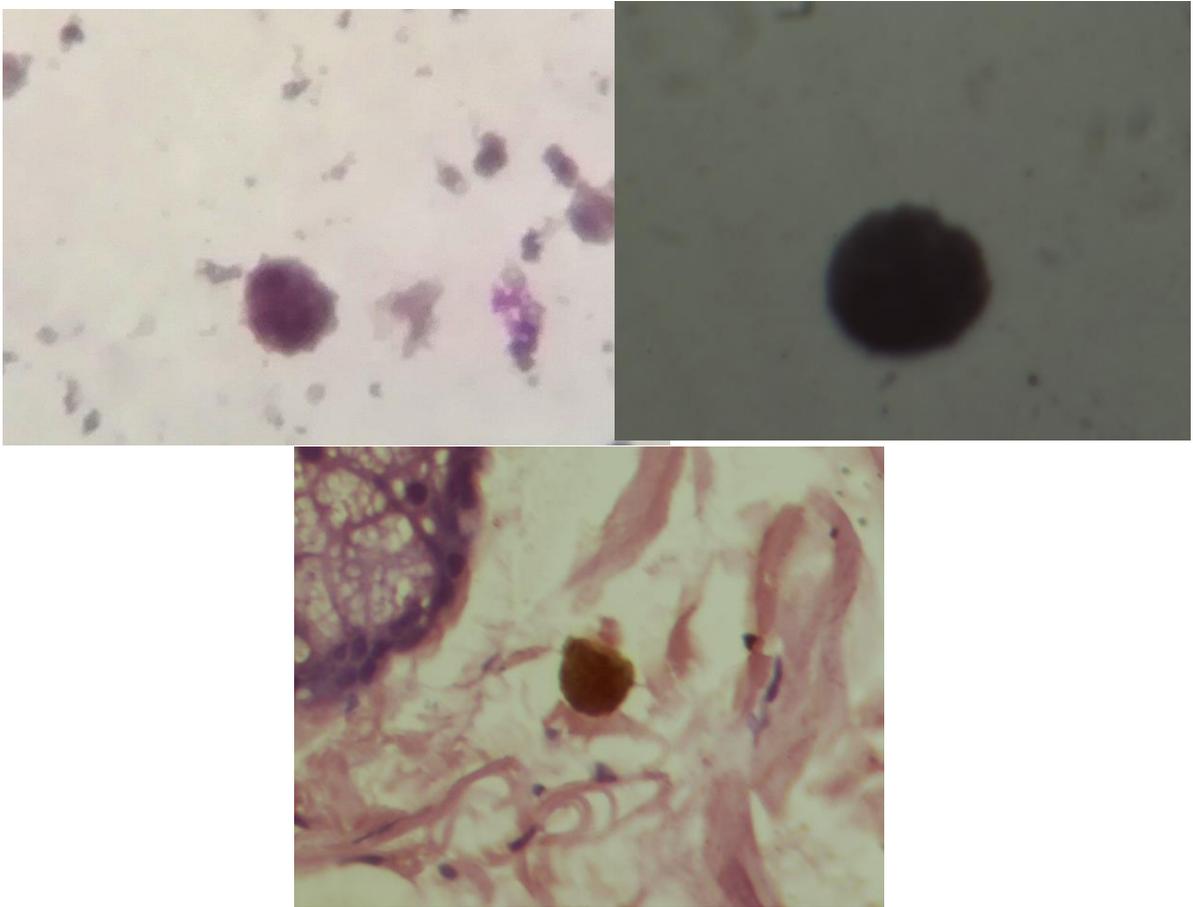


Figura 18. Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de cerebro de feto abortado 010517-12. A. Quiste de *Neospora caninum* y presencia de detritus de células cerebrales, método de frotis directo en lamina. 100 x, H&E. B. Quiste de *Neospora caninum*, método de digestión artificial y frotis directo en lamina. 100 X, H&E. C. Quiste tisular en tejido fijado-desparafinado, 100X, H&E.

2. 020517-15

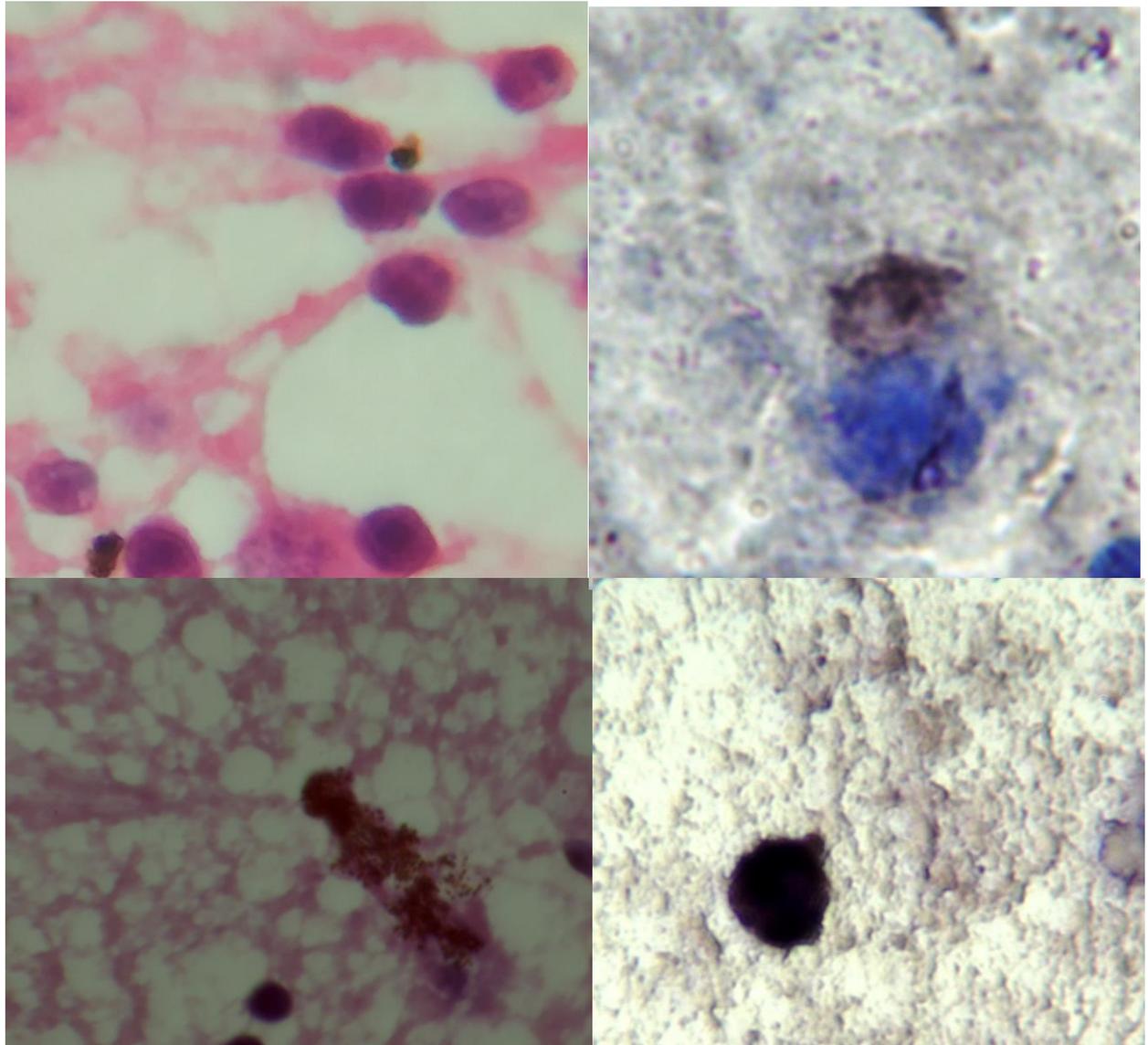


Figura 19. Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de cerebro abortado de feto 020517-15. A. Dos quistes tisulares, método tejido fijado-desparafinado, 100X, H&E. B. Quiste tisular dentro de citoplasma de célula, método de frotis directo en lamina, 100X, H&E. C. Ruptura de quiste tisular, método tejido fijado-desparafinado, 40X, H&E. D. Quiste tisular de gran tamaño, método de digestión artificial y frotis directo en lamina, 100X, H&E.

3. 010617-16

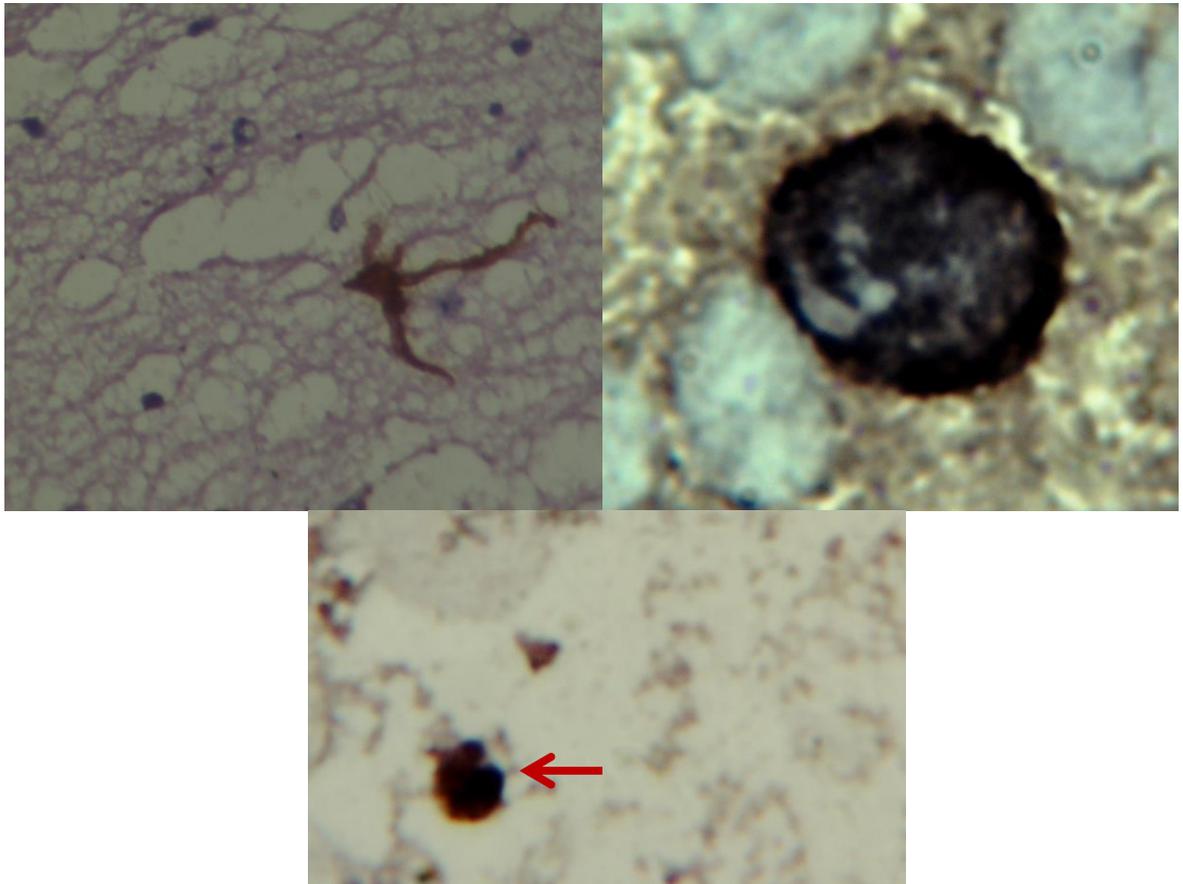


Figura 20 Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de cerebro de feto abortado 010617-16. A. Invasión de *Neospora caninum* a célula neuronal, método de tejido fijado-desparafinado, 40X, H&E. B. Quiste tisular, método de frotis directo en lámina, 100X, H&E

4. 010817-18

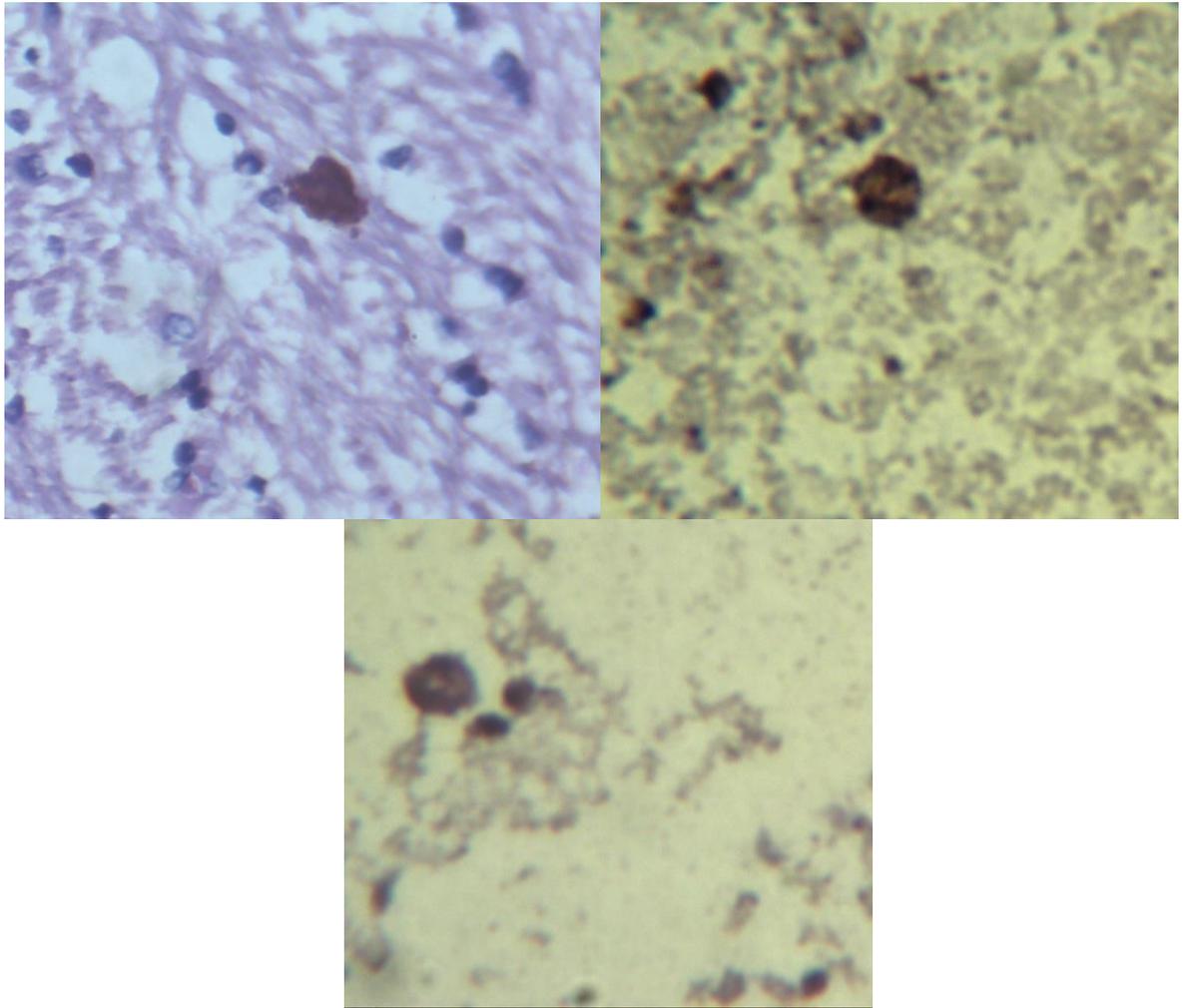


Figura 21 Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de cerebro de feto abortado 010817-18. A. Ruptura de quiste tisular, método de tejido fijado – desparafinado, 100X, H&E. B. Quiste tisular, método de frotis directo en lámina, 100X, H&E. C. Quiste de Neospora caninum método de digestión artificial y frotis directo, 100X, H&E.

5. 010917-19

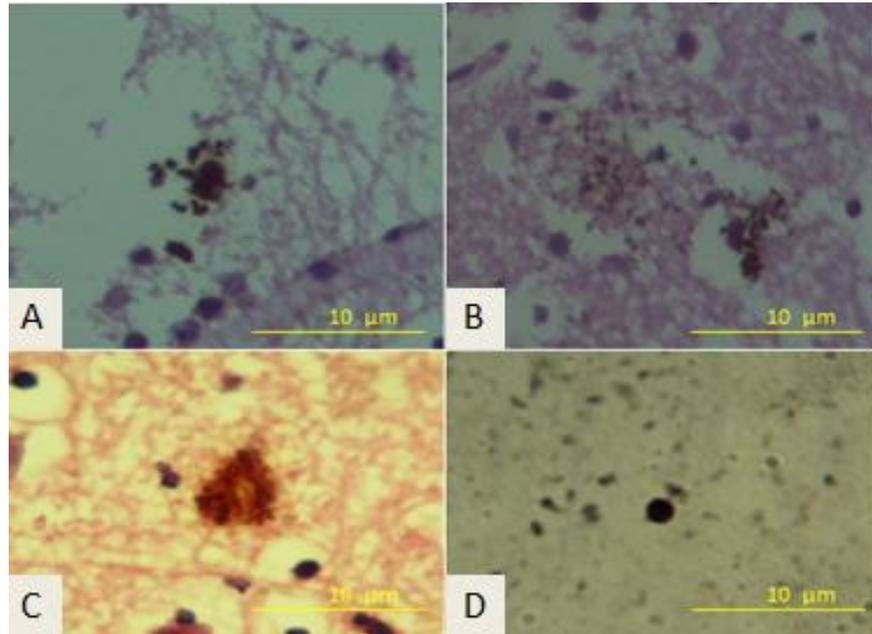


Figura 22 Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de cerebro de feto abortado 010917-19. A Ruptura de quiste tisular, liberación de bradizoitos, método de tejido fijado- desparafinado, 40X, H&E. B. Liberación de bradizoitos por ruptura de quiste, método de tejido fijado-desparafinado, 100X, H&E. C. Quiste de *Neospora caninum*, método de digestión artificial y frotis directo, 100 X, H&E.

6. 011217-20

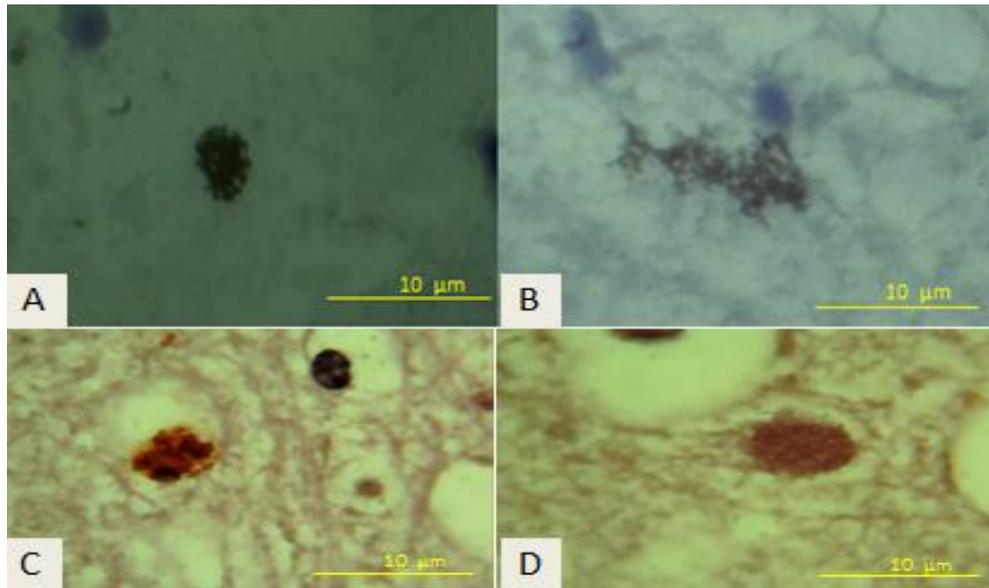


Figura 23 Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de cerebro de fetos abortados 011217-20. A. Ruptura de quiste tisular, método de digestión artificial y frotis directo en lámina, 100X, H&E. B. Bradizoitos después de ruptura de quiste, método de frotis directo en lámina, 100 X, H&E. C. Presencia de quiste, en método de tejido fijado-desparafinado, 100X, H&E. D. presencia de quiste tisular en muestra fijada -desparafino, 100X, H&E.

7. 10517-15

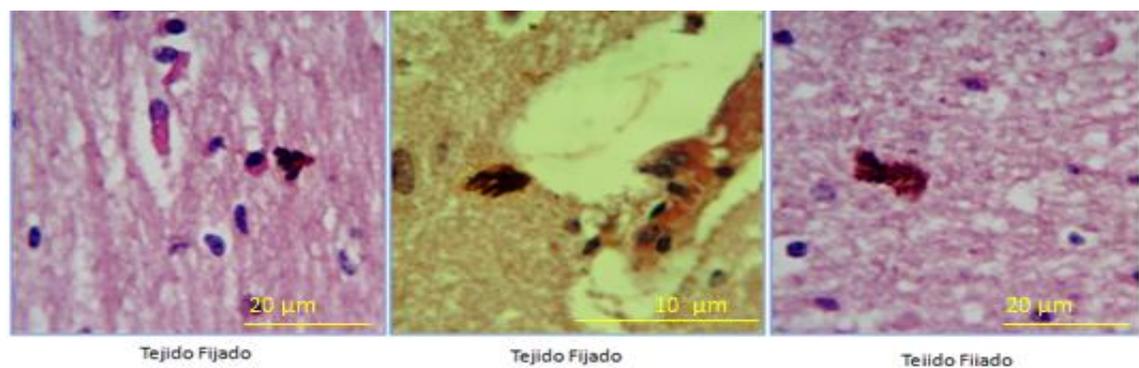


Figura 24 Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de cerebro vaca adulta 10517. Presencia de estructuras marrones compatibles con la presencia de *Neospora caninum*, método de tejidos fijados-desparafinados, 40X, H&E.

8. 20917-7

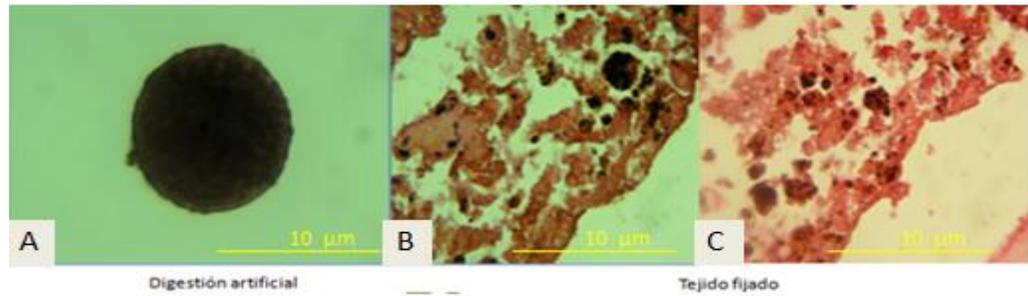


Figura 25 Inmunohistoquímica e Inmunocitoquímica de placenta 20917-7. A. Gran quiste tisular de *N. caninum*, método de digestión artificial y frotis directo, 100X, H&E. B y C. Quistes y bradizoitos, método de tejido fijado-desparafinado, 40 X, H&E.

3.3. Evaluación del efecto citopático y expansión del aislamiento clonal en la línea celular Vero

Se realizó la infección a células Vero con una confluencia mayor al 70%. Inicialmente se detectó la internalización de *N. caninum* en el citoplasma de las células en aproximadamente 20 minutos post-infección. Adicionalmente, se observaron las células a las 24, 48 y 72 horas. Se obtuvo una mayor visualización de invasión en citoplasma celular entre las 48 y 72 horas con formación de quistes de gran tamaño.

1. 010517-12

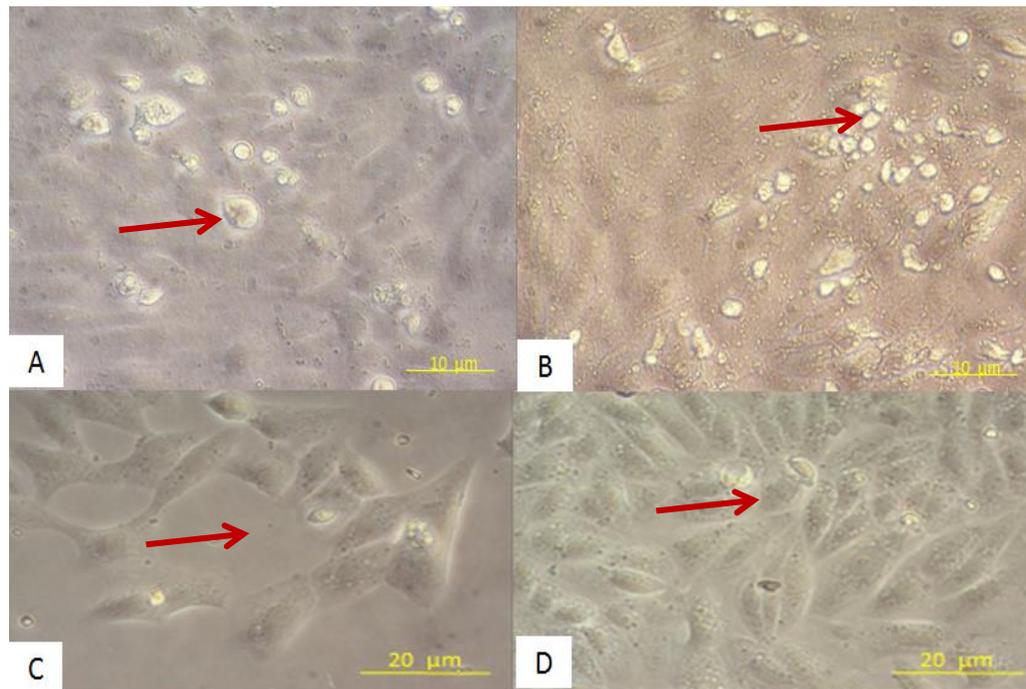


Figura 26 Expansión clonal de *Neospora caninum* 010517-12 en células vero 010517-12. Ay B. Invasión de citoplasma de la célula, formación de la vacuola parasitofora. a las 48 horas, 20x citotoxicidad por efecto citopático. CyD. Efecto citopático marcado y pérdida de la morfología de las células vero, 72 horas post-infección, 20x microscopía invertida.

2. 020517-15

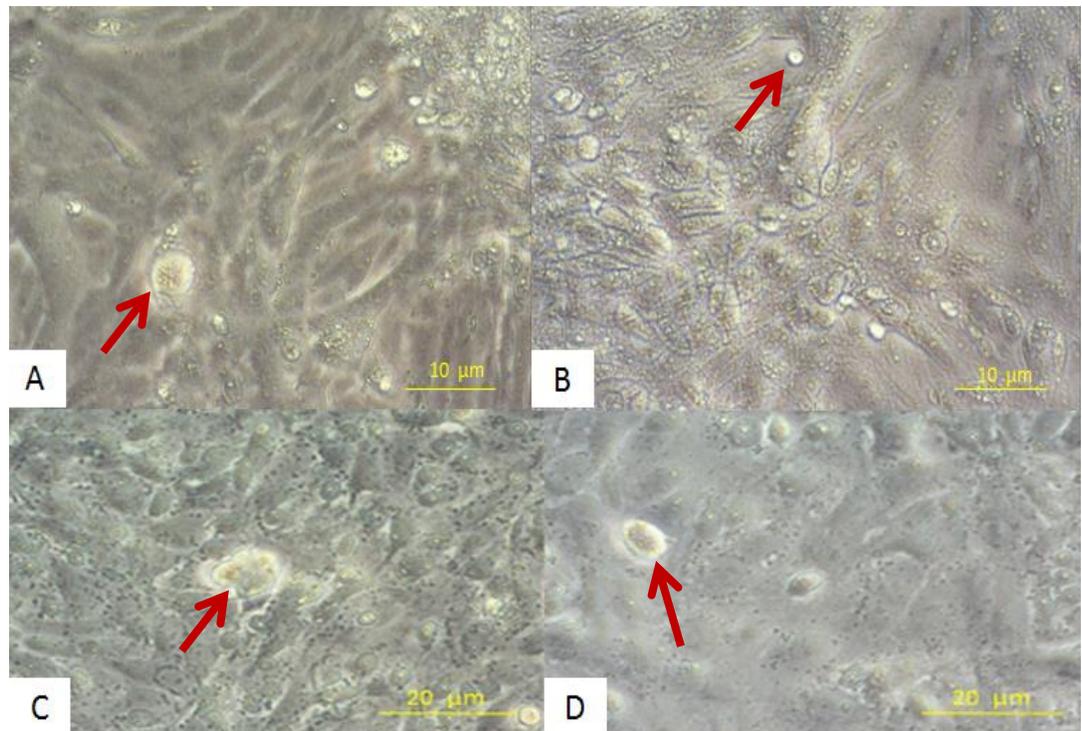


Figura 27 Expansión clonal de *Neospora caninum* 020517-15 en células vero. A. Quiste en formación (flecha roja), pérdida de la morfología de las células vero, 48 horas post-infección 20x. B. Quiste pequeño (flecha roja), invasión de citoplasma de las células vero, 48 horas post-infección. 20x C. Formación de vacuola parasitofora, 72 horas post-infección (flecha roja), invasión de citoplasma de células vero. 20x D. Quiste en formación (flecha roja), pérdida de la morfología de las células vero, 72 horas post-infección 20x citotoxicidad por efecto citopático.

3. 010617-16

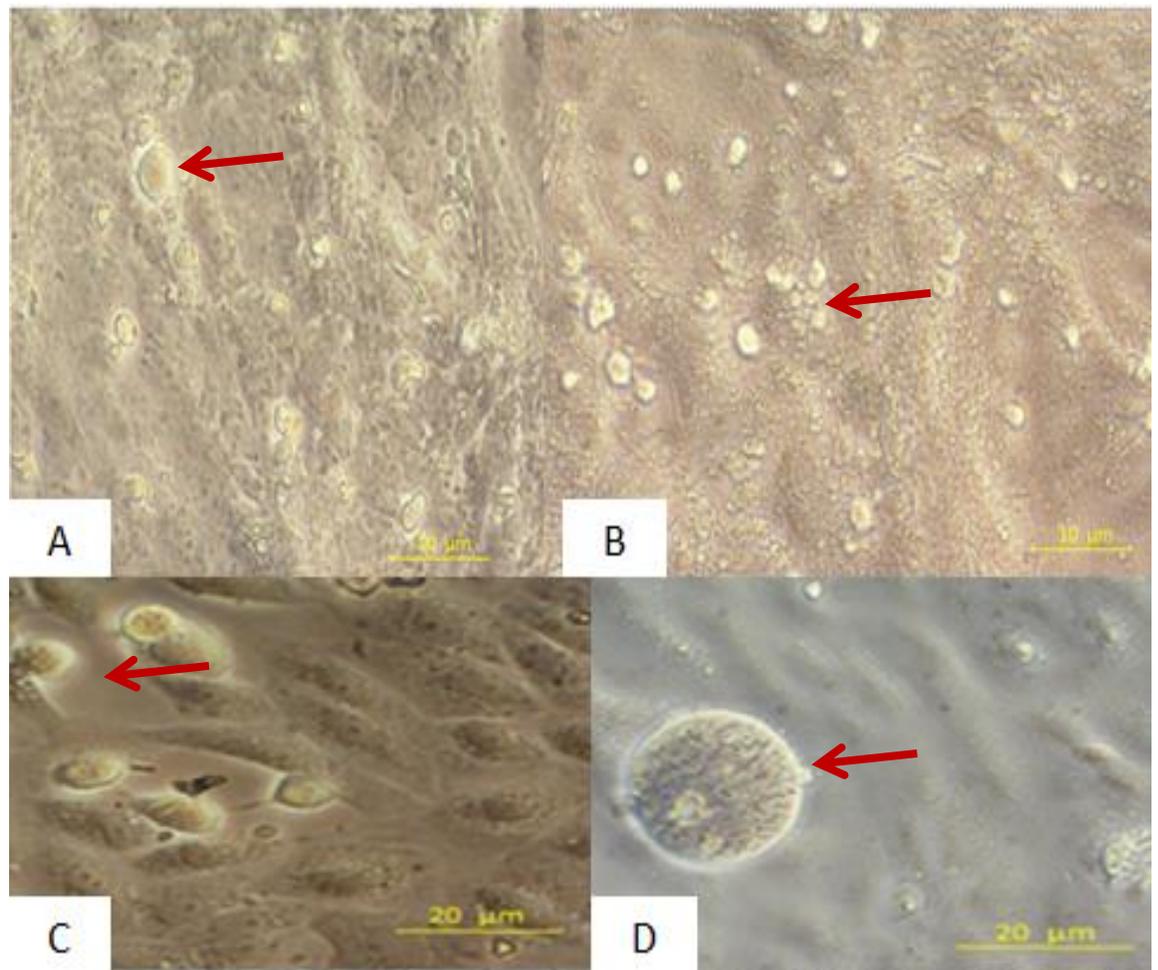


Figura 28 Expansión clonal de *Neospora caninum* 010617-16 en células vero. A. Formación de vacuola parasitofora después de internalización citoplasmática (flecha roja), pérdida de la morfología de las células vero. 48 horas post-infección 20X. B. Internalización citoplasmática de las células vero (flecha roja). 48 horas post-infección 20X. C. Efecto citopático de las células vero por invasión parasitaria (flecha roja), 72 horas post-infección 20X. D. Formación de quiste de gran tamaño (flecha roja), cambios en la morfología de las células vero, 72 horas post-infección, 40X. citotoxicidad por efecto citopático.

4. 010817-18

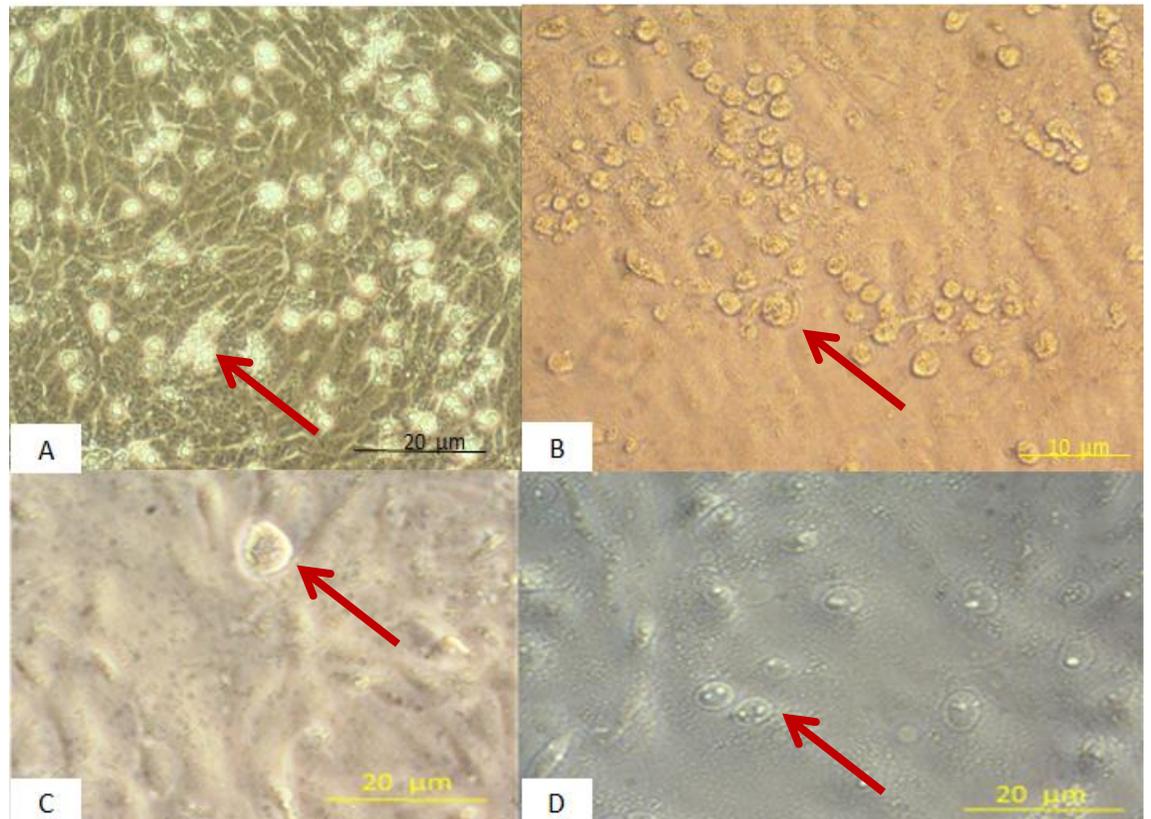


Figura 29 Expansión clonal de *Neospora caninum* 010817-18 en células vero. A y B. Invasión citoplasmática de *Neospora caninum* en gran cantidad de células vero (flechas rojas), a las 48 horas post-infección. 20X C. Quiste en formación (flecha roja), 20X, 27 horas post-infección. C. internalización de *Neospora caninum* en células Vero (flecha roja), pérdida de la morfología de las células vero. Efecto citopático, 72 horas post-infección 20X. citotoxicidad por efecto citopático.

5. 010917-19

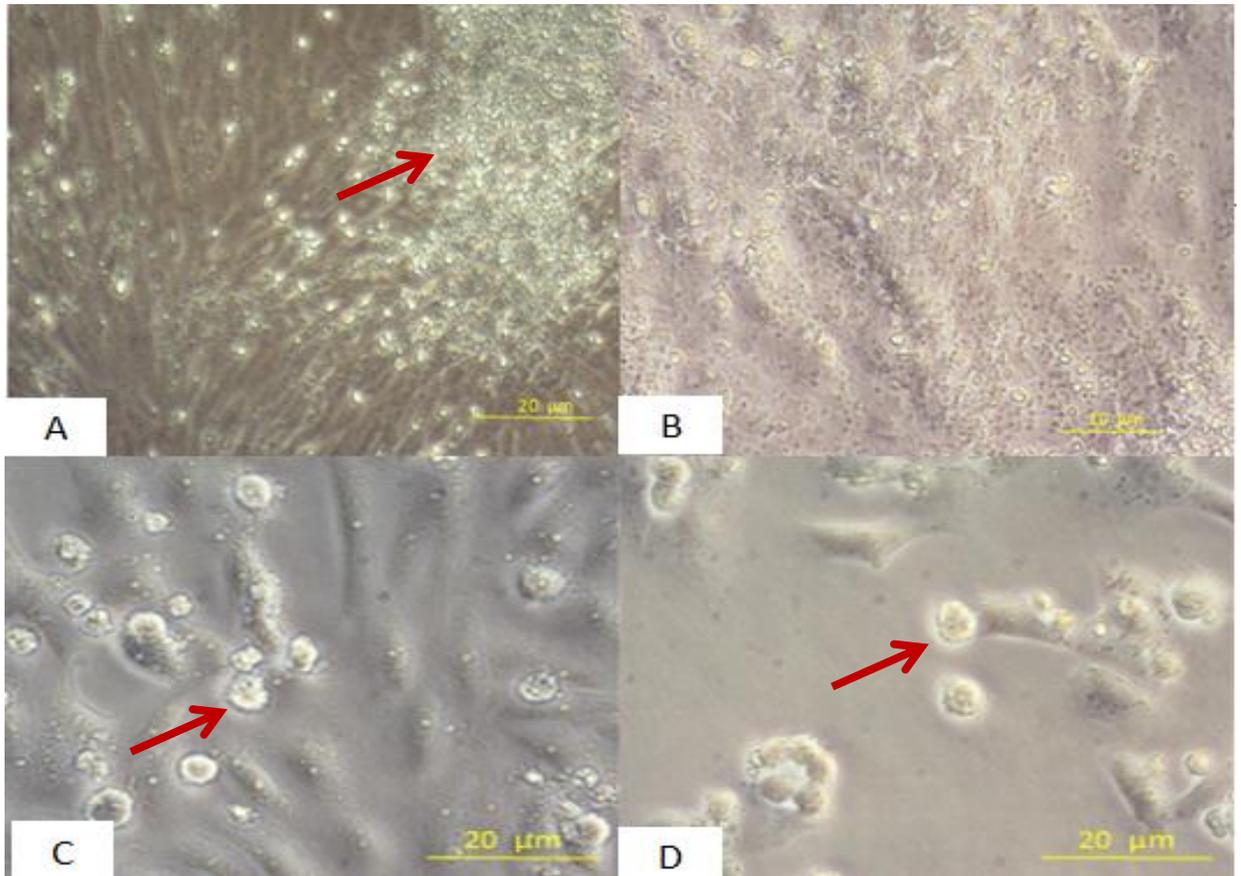


Figura 30 Expansión clonal de *Neospora caninum* 010917-19 en células vero. A. Gran invasión de citoplasma de células vero (flecha roja) con pérdida de la morfología celular, posible inicio de formación de quiste tisular. 48 horas post-infección, 10X. B. pérdida de la morfología de las células vero por invasión de *Neospora caninum*, 48 horas post-infección 10X. C. Formación de quistes (flecha roja), efecto citopático, 72 horas post-infección 20X. C. Marcado efecto citopático y formación de quiste (flecha roja), 72 horas post-infección, 20X. citotoxicidad por efecto citopático.

6. 011217-20

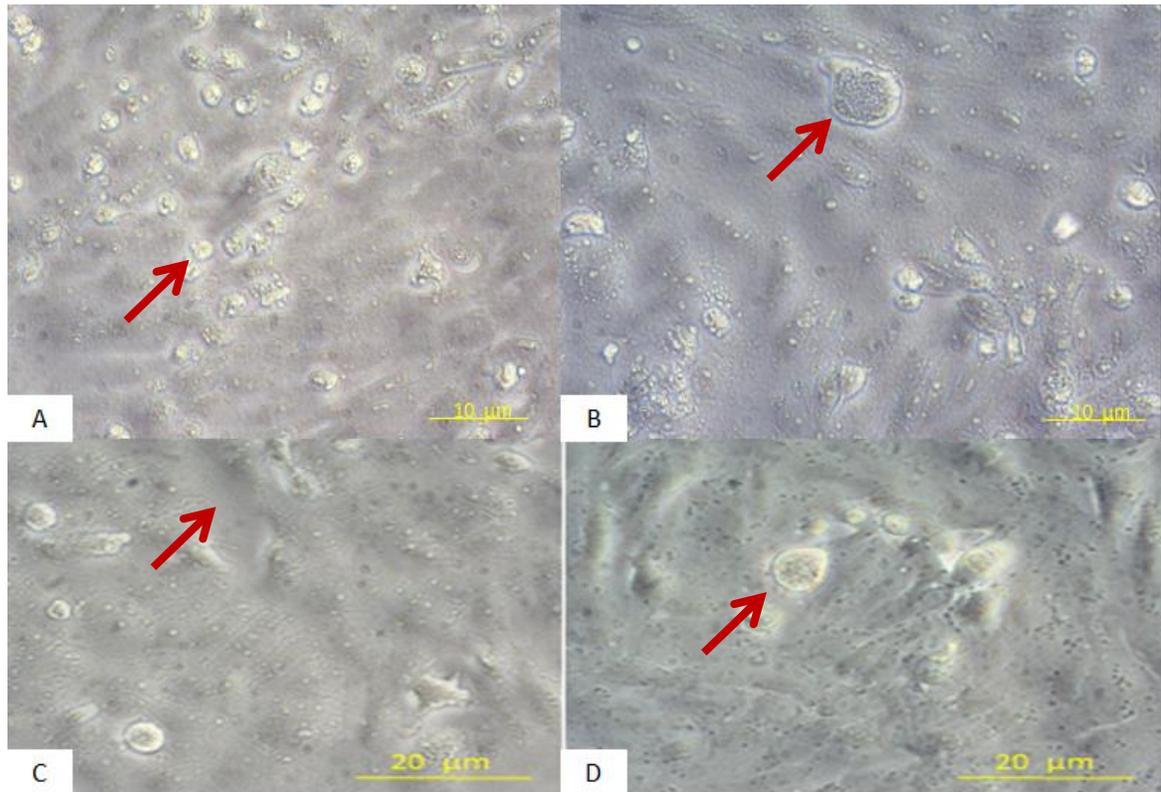


Figura 31 Expansion clonal de *Neospora caninum* 011217-20 en células vero. A. Invasión citoplasmática, formación de vacuola parasitofora (flecha roja), 48 horas post-infección, 20X. B. Formación de quiste (flecha roja), invasión citoplasmática y pérdida de la morfología de las células vero, 48 horas post-infección, C. Efecto citopático (flecha roja), pérdida de morfología celular. 72 horas post-infección, 20X. D. Quiste en formación (flecha roja), pérdida de la morfología celular. 72 horas post-infección, 20X. citotoxicidad por efecto citopático.

3.3.1. Evaluación inmunocitoquímica de células vero-infectadas.

Se pudo observar el citoplasma de las células Vero invadido de *N. caninum*, en algunos casos con ruptura de quistes (figura 31-36).

1 010517-12

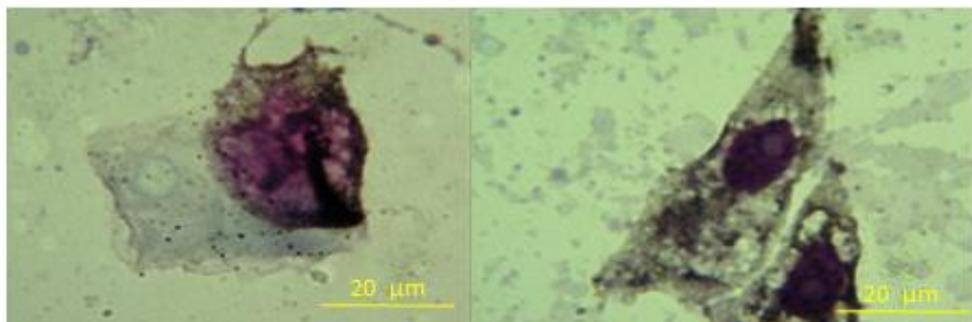


Figura 32 Inmunocitoquímica en células vero post-infección 010517-12. Regiones en citoplasma color marrón- confirmación de Invasión citoplasmática de *N. caninum*. 100X. contratinción Wright.

2 020517-15

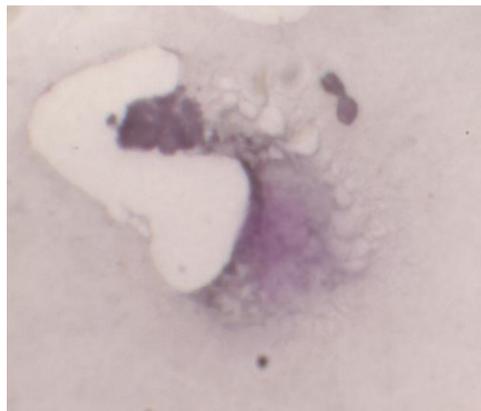


Figura 33 Inmunocitoquímica en células Vero post-infección 020517-15. Invasión de citoplasma de célula vero, formación de vacuola parasitaria. 100X. contratinción Wright.

3 010617-16

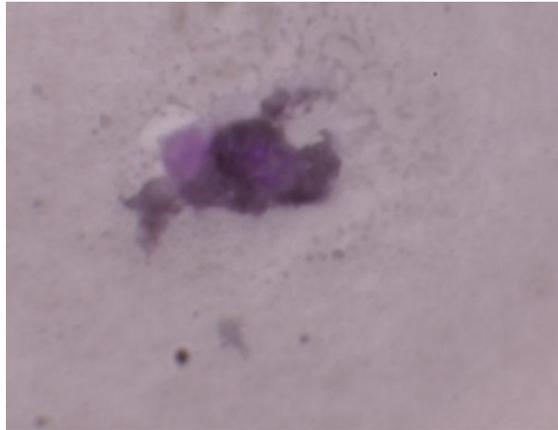


Figura 34 Inmunocitoquímica en células vero post-infección 010617-16. Invasión de *Neospora caninum* a citoplasma de célula vero. 100X. contratincion Wright

4 010817-18

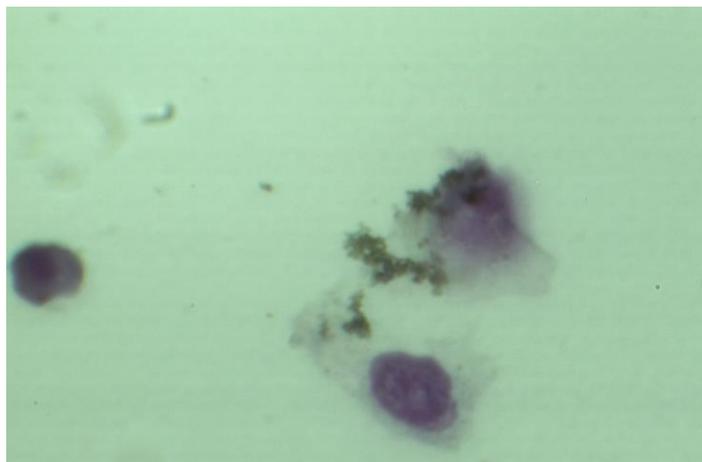


Figura 35 Inmunocitoquímica en células vero post-infección 010817-18. Internalización de formas parasitarias en dos células vero. 100X. contratincion Wriigth.

5 010917-19



Figura 36 Inmunocitoquímica de células vero post-infección 010917-19. Invasión citoplasmática de *Neospora caninum* en células vero. 100X. contratincion Wright.

6 011217-20

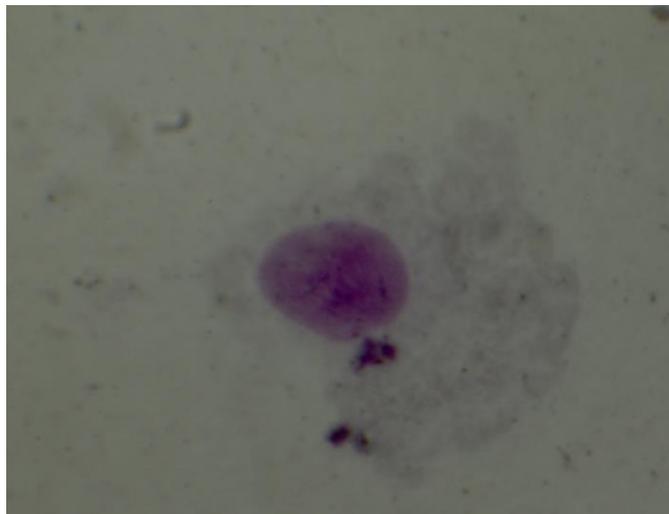


Figura 37 Inmunocitoquímica de células vero post-infección 011217-20. Internalización de *Neospora caninum* a célula vero. 100X. contratincion Wright.

3.4. Detección molecular

3.4.1. Evaluación de métodos de extracción de DNA y cuantificación de producto de extracción.

Tabla 4 *Métodos implementados en la extracción de DNA de *Neospora caninum*.

Protocolo	Purificación de la muestra	Reactivos	Temperatura	Tiempo	Observaciones
ruptura mecánica con arenilla vidrio estéril	no	no	ciclos congelación a -20 °C 24 horas y 11 ciclos de congelación y descongelación a 37°C	24 horas	amplificación PCR y banda electroforesis (primers Np 21 plus y Np 6 plus (figura 39)
Ruptura mecánica con perlas de zirconio estériles. disruptor 3 ciclos	no	buffer TE 1x	congelación a -20 /15 min y descongelación 37°C / 15 min	2 horas	No hubo amplificación ni presencia de bandas del producto de PCR
Sonicación	no	Buffer PBS	-	1 hora	No amplificación, no bandas de producto de PCR
Calor	Cloroformo-alcohol isoamílico (protocolo IBUN)	MEM	100°C	15 minutos	No se observa presencia de DNA en gel de agarosa al 0.8%.
Calor	no	MEM	100°C	15 minutos	Se observa amplificación en PCR en tiempo real
Ruptura enzimática	Cloroformo-alcohol Isoamílico (protocolo IBUN)	500 microlitros Buffer de lisis + 100 microlitros proteinasa k (20mg/ml) (Dubey, et al., 2017)	37°C	1 hora	No se observa presencia de DNA en gel de agarosa al 0.8%.

Tabla 5* Métodos implementados en la extracción de DNA de *Neospora caninum*.

Protocolo	Purificación de la muestra	reactivos	Temperatura	tiempo	Observaciones
Ruptura enzimática	Cloroformo-alcohol Isoamílico (protocolo IBUN)	500 microlitros Buffer de lisis + 10 microlitros proteinasa k (20mg/ml) (Dubey, et al., 2017)	55°C	20 horas	Se observa degradación de DNA en gel de agarosa al 0,8%
Ruptura enzimática + disrupción 3 ciclos	Fenol - Cloroformo-alcohol Isoamílico	500 microlitros Buffer de lisis (Dubey, et al., 2017) + 10 microlitros proteinasa k (20mg/ml)	37°C	12 hora	Se modifican los tiempos de los protocolos enzimáticos, pero se observa degradación de DNA
Ruptura enzimática + disrupción 3 ciclos	Cloroformo puro grado molecular	Buffer de lisis + proteinasa k (10mg/ml) (protocolo de Instituto de Genética de Universidad Nacional)	55°C	1 hora	Se precipita con etanol absoluto por 1 hora a -20°C. Precipitación. Presencia de banda en gel de agarosa al 0.8%. Resultado negativo en PCR convencional
Ruptura enzimática + disrupción 3 ciclos	Cloroformo puro grado molecular	300 microlitros Buffer CTAB 2% + proteinasa k (20mg/ml)	57°C	1 hora	Se uso 12 microlitros de proteinasa K. Se observa degradación de DNA en gel de agarosa al 0,8% y presencia de RNA.
Ruptura enzimática + disrupción 4 ciclos	Fenol - Cloroformo-alcohol Isoamílico	Buffer de lisis (protocolo de Instituto de Genética de Universidad Nacional) + RNAsa	55°C	12 hora	Precipitación con etanol absoluto. Se observa producto degradación de DNA.

3.4.2. Aplicación de la técnica PCR Convencional en productos de extracción infectadas con *Neospora caninum* y Cuantificación de producto de PCR

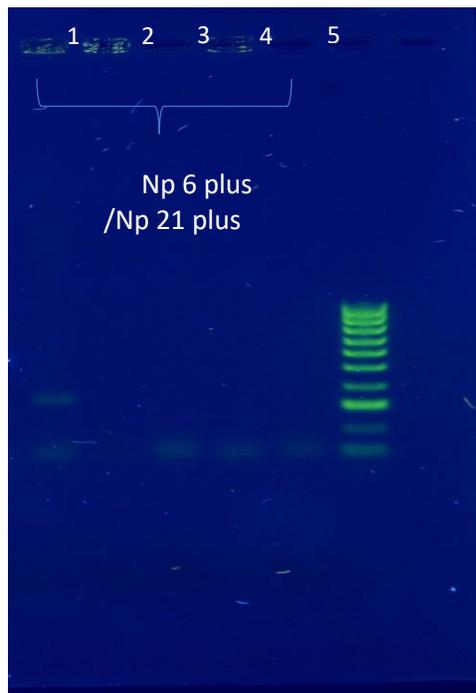


Figura 38. Visualización de amplimero 010517-12. Amplificación de la muestra número 1, método de extracción mediante arenilla de vidrio estéril y ciclos de congelación -20°C y descongelación 37°C (flecha roja), primers Np6 plus y Np21 plus. PCR convencional. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. SYBR Safe DNA stain. Muestras 2,3 y 4 no amplificaron. Muestra 5. Control negativo (agua).

3.4.3. Implementación de la técnica de PCR en Tiempo Real en células Vero-infectadas.

En la PCR en tiempo real se observó la amplificación de los fragmentos en todas las muestras. Por lo cual, las seis muestras pertenecientes a fetos abortados de Cundinamarca y Cesar fueron positivas a *N. caninum*.

Tabla 6 Resultados de PCR en tiempo real de las células vero-infectadas.

Muestra	qPCR (resultado)	Tm
010517-12	Positivo	80.59
020517-15	Positivo	82.59
010617-16	Positivo	80.86
010817-18	Positivo	80.38
010917-19	Positivo	80.16
011217-20	Positivo	80.93
Control Células vero no infectadas	Negativo	67.95

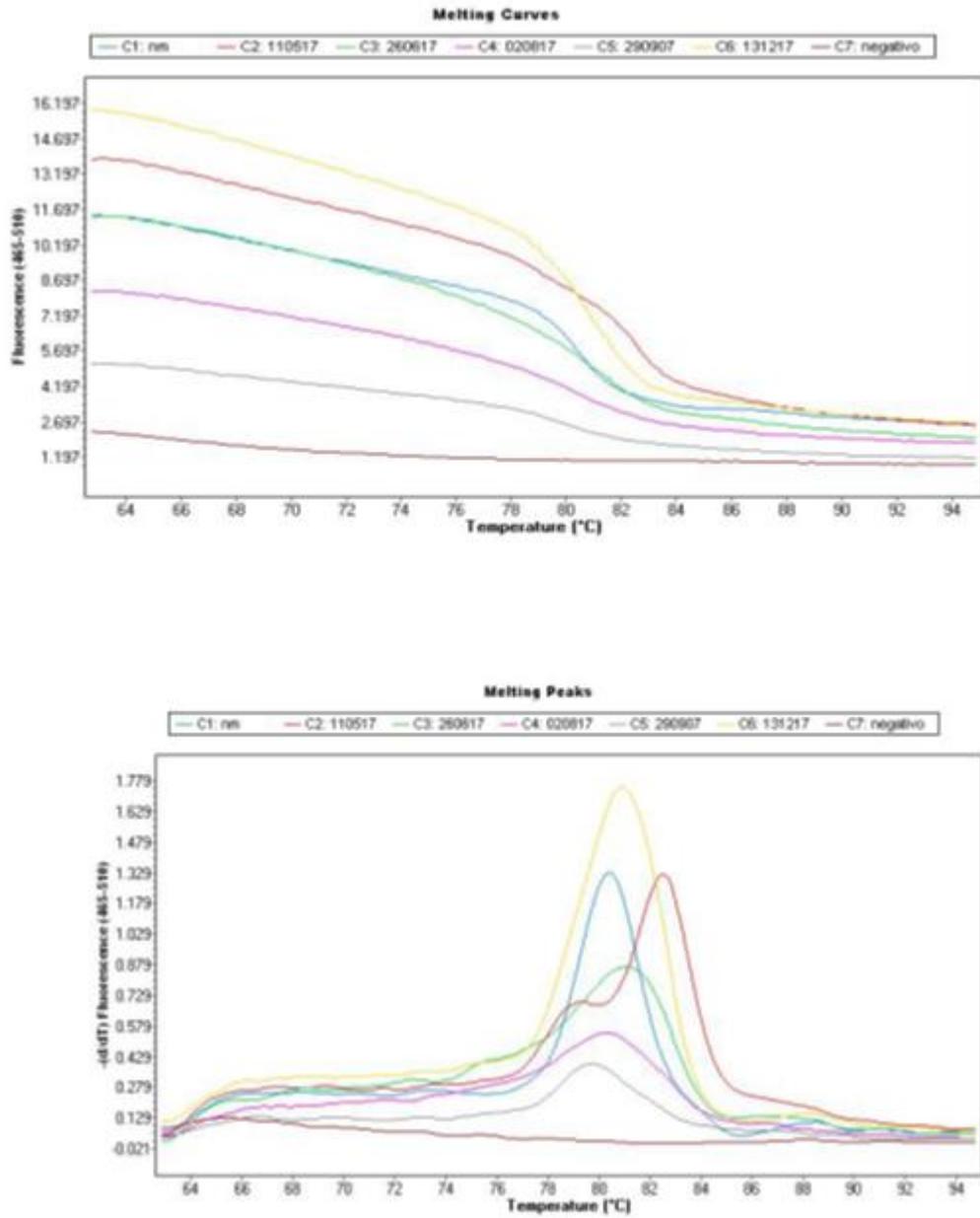


Figura 39 Curvas de amplificación de PCR en tiempo real de células vero-infectadas.

4. Discusión

Neosporosis bovina es una enfermedad reproductiva de gran impacto económico, que ocasiona abortos y otras complicaciones reproductivas y productivas. Esta enfermedad puede ser transmitida de forma horizontal por la ingestión de ooquistes presentes en agua o alimento contaminada con *Neospora caninum*. También puede ser transmitida por la vía transplacentaria exógena, se lleva a cabo una primoinfección o la transmisión transplacentaria endógena que ocurre en animales infectados previamente dándose recrudescencia de la enfermedad durante la preñez (Dubey *et al.*, 2007).

Neosporosis Bovina es considerada epidémica en casos donde hay una infección primaria por la ingestión de ooquistes y cerca del 15% de las vacas tienen riesgo de abortos en un tiempo de 4 semanas. Sin embargo, cuando los abortos persisten por varios meses o años, se califica como enfermedad de comportamiento endémica. (Dubey *et al.* 2007; 2017).

En este estudio los abortos reportados en los departamentos de Cundinamarca y Cesar se presentaron de forma consecutiva durante los meses de mayo a diciembre del 2017. De igual manera, en las fincas estudiadas presentaron antecedentes de abortos, lo cual indica un comportamiento endémico y una transmisión vertical transplacentaria endógena. Con base en lo anterior, tanto los resultados obtenidos en estudios en Colombia desde el 2001, reafirman el comportamiento endémico de *N.caninum* (Azumendi *et al.*, 1995; Zambrano *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2003; Andrade *et al.*, 2007; López, *et al.*, 2007; Oviedo *et al.*, 2007; Oviedo *et al.*, 2008; Peña, *et al.*, 2012; Cedeño & Benavides, 2013; Medellín *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2014; Motta *et al.*, 2014; Cardona *et al.*, 2015; Chaparro *et al.*, 2016; García-Chaparro *et al.*, 2014; Medellín *et al.*, 2017; Llano *et al.*, 2018).

Los síntomas ocasionados por Neosporosis Bovina pueden ser reportados en terneros menores de 2 semanas. En la que se incluye pérdida de peso y ataxia (Kamali *et al.*, 2014). En el caso de los dos terneros fallecidos a los pocos días de nacer manifestaron ataxia, dificultad para incorporarse y convulsiones. Sumado a la sintomatología, los resultados histopatológicos en tejido cardiaco de uno de los terneros y en cerebro de los ambos terneros

quistes tisulares, congestión de vasos sanguíneos y focos hemorrágicos. Así pues, los síntomas, hallazgos histopatológicos, la edad de los terneros y las características endémicas de la enfermedad en las fincas, se le pudo atribuir la muerte de los terneros a *Neospora caninum*.

En el estudio realizado en dos fincas de Cundinamarca y Cesar, dos fetos remitidos al laboratorio fueron abortados en el primer trimestre, dos en el segundo trimestre y dos hacia el último trimestre de gestación. Para Llano, *et al.*, 2018 varios autores han asociado la muerte embrionaria fetal temprana con la infección de *Neospora caninum* principalmente producida por la ausencia de la capacidad inmunológica del feto y las lesiones causadas por el parásito en el tejido placentario. Para Dubey, *et al.*, 2017, la muerte fetal puede ocurrir por los efectos adversos de citoquinas particularmente en la placenta. La severidad de las lesiones en placenta y la fuerte respuesta de IFN-gamma en algunos fetos, posiblemente hace parte de la respuesta inmune tratando de controlar la alta parasitemia, causando muerte fetal.

Con relación a la presencia de atriquia en 4 de los 6 de los fetos remitidos al laboratorio se puede atribuir a la deficiencia en la respuesta inmune del feto, sumado a la presencia de hemorragias y congestión, lo cual impide el normal desarrollo fetal. Dubey, *et al.*, 2017, mencionan en el libro Neosporosis Bovine, que una respuesta específica a anticuerpos de los fetos contra *Neospora caninum* fue encontrada desde el día 100 de la gestación en adelante. Por su parte, la respuesta celular mitótica fue detectada después de 12 semanas de gestación en células sanguíneas fetales y después de 14 semanas en timo y bazo. La atriquia de observo en el primer y segundo trimestre de gestación, etapas de la gestación donde el feto no posee un sistema inmune óptimo. Aun no se ha descrito la ausencia de pelo en fetos abortados, sin embargo, es un hallazgo notable el cual requiere de una mayor profundización.

En el 2000, Sawada *et al.*, examinaron cerebro de una vaca adulta naturalmente infectada con *N. caninum*, dicha vaca presentó dos abortos en ambos casos a los 4 meses de gestación, sin embargo, permaneció clínicamente normal y fue sacrificada 24 días después del segundo aborto para evaluar cerebro. En contraste con lo anteriormente mencionado, en el estudio desarrollado en el laboratorio, los propietarios reportaron presencia de sintomatología

nerviosa en la vaca adulta y fallece días después de haber abortado un feto de 6 meses. Posteriormente, se remitieron los tejidos al laboratorio, donde se realizó prueba de histopatología e inmunohistoquímica. En los resultados de histopatología en cerebro se evidenció; congestión de vasos sanguíneos, edema, gliosis, presencia de células proinflamatorias. Del mismo modo fue positivo a la IHQ. Por su parte, no se observaron lesiones en los demás tejidos evaluados. Según Sawada *et al*, 2000 el cerebro es uno de los órganos de reactivación de los taquizoitos que pueden entrar a flujo sanguíneo y afectar el desarrollo del feto. Por lo cual, uno de los mecanismos de reactivación del parásito puede ser la preñez, sin embargo, aún este mecanismo no ha sido demostrado.

Caspe *et al*, 2012, encontraron placentitis severa caracterizada por una autolisis, necrosis de mesénquima y células trofoblásticas en vellosidades fetales y una mineralización de vellosidades cotiledonarias. Así pues, la IHQ reveló *N. caninum* en todas las placentas y fetos analizados. Dichos hallazgos fueron encontrados en la placenta remitida al laboratorio durante el estudio, de igual manera, se encontraron múltiples estructuras cocobacilares extracelular y dentro de macrófagos, que fueron identificadas como *Neospora caninum* por el método de inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

En la histopatología de cerebro se ha reportado presencia de congestión perivascular, gliosis focal, vasos sanguíneos congestionados, hipotrofia de células endoteliales, encefalitis supurativa, hemorragias focales y multifocales, edemas, encefalitis no supurativa y quistes de *Neospora caninum* (Oviedo *et al.*, 2008; Nematollahi *et al.*, 2013; Barbosa de Macedo *et al.*, 2017). En los fetos abortados y remitidos al laboratorio FUNCEP, se encontró congestión, edema, hemorragias generalizadas y autolisis. Según Dubey *et al.*, 2017 los fetos abortados presentan autolisis o momificación. En algunos casos antes de los 5 meses los fetos pueden ser momificados y permanecen durante meses en el útero de la madre. Por su parte, el proceso de autolisis podría enmascarar las lesiones por Neosporosis Bovina (Pescador *et al.*, 2007), dentro de este proceso el órgano más afectado por la autolisis es el cerebro (Dubey y Schares, 2006). En los fetos remitidos al laboratorio a pesar de su estado autolíticos de algunos cerebros fue posible identificar quistes de *N. caninum*.

Hacia el 2002, Moore, *et al.*, identificaron *N. caninum* por Inmunohistoquímica en 20 de 240 fetos, también detectaron fetos positivos a inmunohistoquímica en 67.4% de los 43 fetos abortados con lesiones histopatológicas compatibles. De igual manera, en el 2009, Cabral, *et al.* Reportaron en su estudio, que la mayoría de las lesiones se encontraban en cerebro, y el 8,6% de los cerebros de los fetos fueron positivos a Inmunohistoquímica. Del mismo modo, en el 2017, Barbosa de Macedo *et al.*, evaluaron 36 cerebros de fetos abortados, de los cuales 14 fueron positivos a IHQ. Por su parte, Pescador *et al.*, 2007 afirman en su estudio que el cerebro es el órgano más eficiente para la Inmunohistoquímica porque aparentemente es más fácil de visualizar los taquizoitos en este órgano que en otros, además menciona que este aspecto esta probablemente asociado a la baja celularidad presente en el cerebro en comparación con otros órganos.

En contraste, en todas las muestras de cerebro remitidas al laboratorio, se observaron diferentes estructuras de color marrón, lo cual indica la presencia de *Neospora caninum*, este hallazgo es comparado con el estudio reportado en el 2008, en Colombia por Oviedo *et al.*, donde se estudiaron muestras de cerebro, cerebelo y medula de 108 fetos mayores de cinco meses, en el cual la coloración Inmunohistoquímica (IHQ) para detección del parásito fue negativa, no obstante, no se descartó la presencia del agente. Para Pescador, *et al*, 2007, la ausencia de asociación entre IHQ y lesiones en cerebro está en el hecho que la exanimación histología no es apropiada en muchos casos debió a la consistencia líquida y autólisis. De igual manera, describen que el cerebro aun estado de autólisis es susceptible para IHQ *anti-N. caninum*. La anterior afirmación fue demostrada en el laboratorio, ya que a pesar de que la mayoría de los cerebros presentaban autólisis, fue posible observar el microorganismo sometiendo la muestra a la técnica de Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.

Cole, *et al.*, 1993 utilizaron el kit anti-mouse IgG y complejo ABPC para detectar la unión del anticuerpo monoclonal MAb 6G7 a taquizoitos y bradizoitos de *N. caninum* en infecciones naturales o experimentales de hospedadores de varias especies, en tejidos seccionados parafinados, fijados en formol bufferado. Se detectó reactividad variada en tejidos de ratones infectados experimentalmente y tratados con acetato de Prednisolona antes de la infección con *N. caninum*. En este caso, algunos grupos de taquizoitos no reaccionaron, otros

reaccionaron débilmente y otro grupo se observó fuerte reacción. Sin embargo, se presentó segunda variación en tejidos de casos naturales de Neosporosis en ternero, los parásitos en tejidos seccionados no reaccionaron con MAb 6G7, pero fue reportada la reacción con anticuerpo policlonal rabbit serum contra *N. caninum*.

Para Donahoe, *et al.*, 2015, los servicios de diagnóstico de patología veterinaria los anticuerpos para inmunohistoquímica para la detección de *N. caninum* son policlonal caprine anti-*N. caninum* (Product Code PAB-NC, VMRD, Inc., Veterinary Medical Research and Development, Pullman, WA, USA). De igual manera, mencionan que en general, los anticuerpos policlonales se prefieren sobre los anticuerpos monoclonales para la prueba diagnóstica de inmunohistoquímica porque ellos exhiben una sensibilidad en detectar antígeno de *Neospora caninum* cuando están presentes. Por esta razón los anticuerpos policlonales son de distribución global y adecuada para protocolo de validación por laboratorios patológicos individuales.

Por su parte, los anticuerpos policlonales son menos específicos que los anticuerpos monoclonales y exhiben reacción cruzada con parásitos Apicomplexa cercanos. Aunque no se utilizan para el diagnóstico de rutina de *Neospora caninum*, los anticuerpos específicos contra bradizoitos (BAG1/BAG5) pueden ser aplicado para diferencias quistes tisulares de taquizoitos agrupados (Donahoe, *et al.*, 2015).

En cuanto a el aislamiento *in vitro* de *Neospora*. En el 2011, Regidor-Cerrillo, *et al.*, evaluaron la proliferación y eficiencia de invasión de *Neospora caninum*. Se analizó el proceso de internalización de los taquizoitos a las células en un intervalo de 2, 4, y 6 horas post inoculación. En el 2000 Kim, *et al.*, observaron dos aislamientos de *N. caninum* en células Vero a los 45 y 56 días después de inoculación. En el 2015, en Argentina se observaron taquizoitos a los 4 días pos-infección, y 14 días después de la infección, más del 60% de las células de la monocapa fueron alteradas y requirieron subcultivo (Campero, *et al.*, 2015). De igual manera, se reportó hacia el año 2004 en Malasia la presencia de taquizoitos a los 14 días después de la inoculación, posteriormente, a las 5 semanas se presentó un aumento en la cantidad de taquizoitos, y se les adiciono medio nuevo, luego se realizó un cambio a células

Vero-nuevas cada 4 días (Cheah, *et al.*, 2004). En comparación con dichos hallazgos, en este estudio inicialmente se observó la invasión del citoplasma de las células Vero a partir de los 20 minutos post infección. Así mismo, en las primeras 72 horas se presentó una invasión mayor al 50% del monocapa celular. También se realizó inmunohistoquímica a las células infectadas, mediante los procesos de tripsinación, obtención de células, centrifugación, fijación en láminas portaobjetos y la Inmunocitología. En algunos casos se pudo ver *N. caninum* invadiendo el citoplasma o en otros casos pérdida de la arquitectura celular. Finalmente, se logró obtener aislamientos clonales para cada una de las seis muestras. En cada uno de los aislamientos clonales se observó la formación de quistes de diferentes tamaños en un mismo proceso de clonación, debido a la cantidad de bradizoitos contenidos.

En algunos estudios se reporta el estado de autólisis de los fetos abortados limita el número de quistes tisulares o taquizoitos, o puede afectar la viabilidad de *N. caninum* (Campero, *et al.*, 2015; Cheah, *et al.*, 2004; Conrad *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 2000). Sin embargo, los seis cerebros de los fetos abortados remitidos al laboratorio fueron sometidos a las pruebas de histopatología, inmunohistoquímica y aislamiento en cultivo celular, así pues, durante el desarrollo de estas pruebas evaluó la calidad de la muestra, con una constante actividad y viabilidad de *N. caninum*, mediante el uso de Azul Tripán a una solución 1:10 y fue observado en microscopio. Así mismo se observaron diferentes estadios, dicho lo anterior se puede establecer que *N. caninum* posee características adaptativas y sobrevive en tejido cerebral por un largo tiempo.

En los resultados de PCR en tiempo real, hubo una amplificación en las seis muestras aisladas. En la actualidad se realiza PCR convencional utilizando los primers Np 21 plus y Np 6 plus, en este estudio se pudo implementar la técnica de PCR en tiempo real como una herramienta eficiente para el diagnóstico de *Neospora caninum*.

Por lo que se refiere a la extracción de DNA de *Neospora caninum* de las seis muestras, se obtuvo a partir de someterlo a una temperatura de 100 grados centígrados por 15 minutos, de igual manera se utilizó ruptura mecánica con arenilla de vidrio sumado a ciclos de congelación y descongelación obteniendo en ambos casos, la amplificación de los primers Np 6 plus y Np

21 en la muestra 010517-12. Sin embargo, en este estudio estas técnicas no fueron reproducibles. Por lo cual se sometieron las muestras a diferentes protocolos de extracción, pero no se obtuvieron los resultados esperados, impidiendo las identificaciones de microsatélites y la nueva realización de PCR convencional y en tiempo real utilizando los primer Np 6 plus y Np 21 plus. Dicho lo anterior, se hace necesario estandarizar un protocolo para la adecuada extracción de DNA de *Neospora caninum* en Colombia.

5. Conclusiones y recomendaciones.

5.1. Conclusiones

Según los resultados observados en este estudio y en relación con los estudios reportados durante los últimos años en Colombia, se pudo confirmar que Neosporosis bovina es una enfermedad endémica reproductiva en Colombia. Además de los estudios de seroprevalencias reportados en varias regiones del país, este estudio permitió confirmar su presencia.

Por su parte, fue posible identificar la presencia de *Neospora caninum* tanto en animales jóvenes como en adultos, mediante técnicas de laboratorio e historia clínica.

La obtención de aislamientos clonales de *Neospora caninum* es un gran aporte para estudios moleculares más específicos y complejos como secuenciación.

Fue posible el diagnóstico de Neosporosis Bovina, gracias a la relación de los antecedentes de las fincas, la historia clínica, los hallazgos de necropsia, histopatológicos, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, aislamientos y PCR.

5.2. Recomendaciones

Con el fin de fortalecer el conocimiento de Neosporosis Bovina, se recomienda ampliar los estudios en varias regiones del país, sobre todo en las regiones con altas seroprevalencias. De igual manera, establecer protocolos de envío y remisión de muestras, incluyendo la obtención de historia clínica, con el fin de introducir la Neosporosis Bovina dentro de las enfermedades infecciosas abortivas de interés y de alta presentación en el ganado bovino.

De igual manera, ampliar los estudios en datos genómicos con el objetivo de desarrollar posibles herramientas biotecnológicas encaminadas al control y prevención de Neosporosis, teniendo en cuenta que es una enfermedad endémica en muchos países y en Colombia.

Bibliografía

- Al-Qassab S. E., Reichel, M. P., & Ellis, J. T. (2010). On the biological and genetic diversity in *Neospora caninum*. *Diversity*, 2(3), 411-438.
- Andrade R.J, Pulido M.O, López J.A, Caycedo A.F. (2003). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en Vacas Holstein en el Valle de Sotaquirá (Boyacá). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 16(3), 53.
- Andrade R.J, Pulido M.O, López J.A, Caycedo A.F. (2007). Análisis prospectivo de la seropositividad de *Neospora caninum* en ejemplares bovinos de raza Holstein de una finca lechera en Toca, Boyacá (Colombia). *Rev Col Cienc Pec*. 20(4), 557.
- Azumendi, J., L., Granada, I., Rey, Y.A...Perez, L.F. (1995). Efectos de la toxina de *Sarcocystis* (*Sarcocystina*). *Revista de Salud Animal*. 17(3): 273-284.
- Barbosa de Macedo, C.A., Barbosa de Macedo, M.F.S., Miura, A.C, Taroda, A., Cardim, S.T., Innes, E.A., Canton, G.J., Chianini, F., Headley, S.A., Garcia, J.L. (2017). Occurrence of abortion induced by *Neospora caninum* in dairy cattle from Santa Catarina, southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol.Vet*. 3(26). 292-298.
- Benavides, J., Collantes-Fernández, E., Ferre, I...Ortega-Mora, L.M (2014). Experimental ruminant models for bovine Neosporosis: what is known and what is need. *Parasitology*, 141 (11):1-18
- Bjerkås, I., Mohn, S. F., & Presthus, J. (1984). Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Parasitology Research*, 70(2), 271-274
- Cabral, A., D., Camargo, C.N., Galleti, N.T.C., Okuda, L.H, Pituco, E.M., Del Fava, C. (2009). Diagnosis of *Neospora caninum* in bovine fetuses by histology, immunohistochemistry, and nested-PCR. 4(18).14-19.

- Campero, L. M., Minke, L., Moré, G., Rambeaud, M., Bacigalupe, D., Moore, D. P. ... Venturini, M. C. (2015). Evaluation and comparison of serological methods for the detection of bovine neosporosis in Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 295–301.
- Cardona, J.A., Martinez, Y., Betancur, C.A. (2015). Seroepidemiología de hembras bovinas naturalmente infectadas por *Neospora caninum* en Córdoba, Colombia. *Rev. U.D.C.A. Act. & Div. Cient.* 18 (2), 401-408.
- Carrillo, A. C., Figueredo, G., K. G. (2014). Determinación de la presencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* y el Virus de Diarrea Viral Bovina y su relación con el desempeño reproductivo de hembras bovinas del Municipio de Oicatá (Boyacá). *Revista CES*, 9(2), 238–247.
- Caspe, S.G, Moore, D.P., Leunda, M.R., Cano, D.B, Linschinsky, L., Regidor-Cerrillo, J., Garcia, G.A., Echaide, I.G., Bacigalpe, D., Ortega-Mora, L.M., Odeon, A.C. (2012). The *Neospora caninum*-Spain 7 isolate induces placental damage, fetal death and abortion in cattle when inoculated in early gestation. *Veterinary Parasitology*. 189(2012). 171-181.
- Cedeño, D., Benavides, B. (2013). Seroprevalence and risk factors associated to *Neospora caninum* in dairy cattle herds in the Municipality of Pasto, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 18(1), 3311–3316.
- Chaparro, J., Olivera, M., Ramírez, N...Palacio, L. (2016). *Neospora caninum* serostatus in dairy cattle of the Northern plains of Antioquia, Colombia. *Rev. MVZ Cordoba*, 21 (3), 5577-5583.
- Cole, R.A., Lindsay, D.S., Dubey, J. P., Blagburn, L. B. (1993). Detection of *Neospora caninum* in tissue sections using a murine monoclonal antibody. *J Vet Diagn Invest.* 5 (1993), 579-584.
- Conrad, P. A., Barr, B. C., Sverlow, K. W., Anderson, M., Daft, B., Kinde, H... & Ardans, A. (1993). In vitro isolation and characterization of a *Neospora* sp. from aborted bovine fetuses. *Parasitology*, 106(3), 239-249.

- Donahoe, S. L., Lindsay, S. A., Krockenberger, M., Phalen, D., Slapeta, J. (2015). A review of Neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal for Parasitology*, 4 (2015), 216-238.
- Dubey, J. P., Carpenter, J. L., Speer, C. A., Topper, M. J., Uggla, A. (1988a). Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 192(9), 1269–1285.
- Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S. & Topper, M.J. (1988b). Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 193(10), 1259-1263.
- Dubey, J., P. (1992). A Review of *Neospora caninum* and Neospora-like infections in Animals. *J. Protozool. Res.*, 2, 40-52.
- Dubey, J.P. Lindsay, D. Speer, A. (1998a) Structure of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites and Sporozoites, and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clin Microbiol Rev*, 11(2) 265- 299.
- Dubey, J.P, Dorrough, K.R, Jenkins...Shen, S.K. (1998 b) Canine neosporosis: clinical signs, diagnosis, treatment and isolation of *Neospora caninum* in mice and cell culture. *Int J Parasitolo.*, 28 (8) 1293 – 1304.
- Dubey, J., P., Clark, T., R., Yantis, D. (2000). *Frenkelia microti* Infection in a Chinchilla (*Chinchilla Laniger*) in the United States. *The Journal of Parasitology*, 5(85), 1149-1150.
- Dubey J.P, Schares b., (2006). Diagnosis of bovine neosporosis *Veterinary Parasitology* 140 (1-2) 1–34
- Dubey, J.P., Schares, G. & Ortega-Mora, L.M. (2007) Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clinical Microbiology Reviews*. 20(2), 323-367.

- Dubey, J.P., Hemphill, A., Calero-Bernal, R., Schares, G. (2017). *Neosporosis in Animals*. Boca Raton. Estados Unidos. CRC Pr I Llc; Edición: 1.
- Favero, J.F., Da Silva, A.S., Campigotto, G., Machado, G., de Barros, L.D., Garcia, J.L., Vogel, F.F. (2017). Risk factors for *Neospora caninum* infection in dairy cattle and their possible causes-effect relation for disease. *Microbial Pathogenesis*. 110(2017), 202-207.
- Frenkel J.K, Dubey J.P (1975) *Hammondia hammondi* gen. nov., sp.nov, from domestic cats, a new coccidian related to *Toxoplasma* and *Sarcocystis*. *Z Parasitenkd.* 46 (1), 3-12.
- Garcia-Chaparro, J. F., Moreno, G., Cruz, A. C. (2014). Prevalencia de *Neospora caninum* y DVB en una finca con problemas reproductivos en Sopó (Cundinamarca). *Ciencia Y Agricultura*, 11(1), 9–16.
- Ghalmi, F., China, B., Ghalmi, A., Hammitouche, D., Losson, B. (2012). Study of the risk factors associated with *Neospora caninum* seroprevalence in Algerian cattle populations. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 655–661.
- GoŹdzik K., Cabaj, W. (2007). Characterization of the first Polish isolate of *Neospora caninum* from cattle. *W. Stefański Institute of Parasitology*, 52(3), 295-297.
- Hao P, Yang N, Cui X., Liu J., Yang D., and Liu Q. (2014). First Isolation of *Neospora caninum* from Blood of a Naturally Infected Adult Dairy Cow in Beijing, *China Journal of Parasitology*. 100(6), 812-816.
- Hecker, Y.P., Cantón G., Regidor-Cerrillo, J., Chianini, F...Moore, D.P. (2015). Cell mediated immune responses in the placenta following challenge of vaccinated pregnant heifers with *Neospora caninum*. *Veterinary Parasitology*. 214 (3), 247-254.
- Hemphil A., Vonlaufen, N., Golaz, J., L., Burgener, A., (2009). Infection of primary canine duodenal epithelial cell culture with *Neospora caninum*. *J. Parasitol.* 95(2), 372-380.

- Jardine, J.E. (1996). The ultrastructure of bradyzoites and tissue cysts of *Neospora caninum* in dogs: absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Veterinary Parasitology*. 62(3), 231-240.
- Kamali, A., Seifi, H. A., Movassaghi, A. R., Razmi, G. R., Naseri, Z. (2014). Histopathological and molecular study of *Neospora caninum* infection in bovine aborted fetuses. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(12), 990–994.
- Kim, H.I., Sohn, H.J., Hwang, W.S... Kim, D.Y., 2000. In vitro isolation and characterization of bovine *Neospora caninum* in Korea. *Vet. Parasitol.* 90, 147–154.
- Klauck, V., Machado, G., Pazinato, R., Radavelli, W. M., Santos, D. S., Carlo, J., Da, A. S. (2016). Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. *Microbial Pathogenesis*, 92, 46–49.
- Llano, B.H. A., Guimaraes, M.S., Soares, R.M., Polo G., Caetano da Silva, A. (2018). Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* infection in cattle from the Eastern Antioquia, Colombia. *Rev. Veterinary and Animal Science*. 1-19
- Leineweber, M., Spekker-Bosker, K., Ince, V... Däubener, W. (2017). First Characterization of the *Neospora caninum* Dense Granule Protein GRA9. *BioMed Research International*. 7, 1-15.
- Lindsay D., Blagburn, L., Braund G., K. (1995). *Sarcocystis spp.* and Sarcocystosis. Department of Pathobiology and Scott- Richey Research Center. 5(3), 249-254
- Locatelli-Dittrich, R., Thomaz-Soccol, V., Richartz, R. R... Pinckney, R. (2004). Isolamento de *Neospora caninum* de feto bovino de rebanho Leiteiro no Paraná. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13(3), 103-109.
- López, G., Restrepo, B. N., Restrepo, M., Lotero, M. A., Murillo, V. E., Chica, A., Giraldo, J. M. (2007). Estudio para Evidenciar la Presencia de *Neospora caninum* en Bovinos de la Hacienda San Pedro en el Municipio de Fredonia. *Revista CES*, 2(1), 7 –20.

- McGuire, A.M., McAllister, M.M, Jolley, W.R. (1997). Separation and Cryopreservation of *Neospora caninum* Tissue Cysts from Murine Brain. *J. parasitol.* 83 (2), 319-321.
- Medellín, P., Orlando, M., Anaya, D., María, A., José, D., Becerra, A., ... José, D. (2013). Determinación de anticuerpos anti *Neospora caninum* en vacas de la provincia de Sugamuxi, Colombia. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 4(4), 501– 506.
- Medellín, P M., García-Corredor, D., & Vargas-Abella, J. (2017). Seroprevalencia de *Neospora caninum* en un Hato Lechero de Boyacá, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(2), 355-362.
- Moore, D.P., Campero, C.M., Odeon, A.C, Poso, M.A., Cano, D., Leunda, M.R, Basso, W., Venturini, M.C., Spath, E. (2002). Seroepidemiology of beef and dairy herds and fetal study of *Neospora caninum* in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 107 (2002). 303-316.
- Motta, J. L., Clavijo, J. A., Waltero, I., Abeledo, M. A. (2014). Prevalencia de anticuerpos a *Brucella abortus*, *Leptospira* sp. y *Neospora caninum* en hatos bovinos y bubalinos en el Departamento de Caquetá, Colombia. *Revista Salud Animal*, 36(2), 80–89.
- Müller, N., Zimmermann, V., Hentrich, B., Gottsteins, B. (1996). Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA Hybridization Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. 34 (11), 2850-2852.
- Nayebzadeh, H., Nourollahi, F., Khalili, M., Zakian, N., Taati, M. (2014). Seroprevalence of *Neospora caninum* infection in Dairy Cattle in West of Iran. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine Istanbul University*, 41(2), 162-166.
- Nematchalli, A., Moghaddam, G.H, Jaafari, R., Ashrafi Helan, A., Norouzi, M. (2013). Study on outbreak of *Neospora caninum*-associated abortion in dairy cows in Tabriz (Northwest Iran) by serological, molecular and histopathologic methods. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 6 (12). 942-946.

- Okeoma C. M., Williamson, N.B., Pomroy, W., E., Stowell K., M., Gillespie, L., M. (2004). Isolation and molecular characterization of *Neospora caninum* in cattle in New Zealand. *New Zealand Journal*. 52(6), 364- 370.
- Oviedo, T., Betancur, C., Mestra, A., Gonzales, M., Reza, L., Calonge, K. (2007). Estudio Serológico sobre Neosporosis en Bovinos con Problemas Reproductivos en Montería, Córdoba, Colombia. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 929–933.
- Oviedo, T., Bustamante, G., Mejía, J. (2008). Estudio Histopatológico e Inmunohistoquímico sobre Neosporosis en Fetos Bovinos Procedentes de Matadero. *Revista MVZ Córdoba*, 13(2), 1343–1348.
- Peña, L. F., Araujo, A. V, Rubio, D. E., Mojica³, C. P., Johan, J., Avendaño³, K. E. (2012). Estudio serológico de DVB, IBR y *Neospora* en bovinos de la microrregión del Valle del Cesar. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(2), 1–6.
- Pérez-Zaballos, F.J., Ortega-Mora, L.M., Alvarez-Garcia, G... Costas, E. (2005). Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. *Journal Parasitology*. 91 (3): 507-511
- Pescador, C.A, Corbellini, L.G. Oliveira, E.C, Raymundo, D.L., Driemeier, D. (2007). Histopathological and immunohistochemical aspects of *Neospora caninum* diagnosis in bovine aborted fetuses. *Veterinary Parasitology*. 150 (2007). 159-163
- Pessoa, A.G., Martini, P., A., Trentin, J., M...Silva, M., A., C., (2016) Impact of spontaneous *Neospora caninum* infection on pregnancy loss and subsequent pregnancy in grazing lactating dairy cows. *Theriogenology*. 85(3), 519-527.
- Regidor-Cerrillo. J., Pedraza, D. S., Gomez, B. M., Ortega, M. L. (2006) Multilocus Microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. *J. Parasitol*, 92(3): 517-524.

- Regidor-Cerrillo, J., Bautista, G., M., Sodupe, I...Mora, O., M., L. (2011). In vitro invasion efficiency and intracellular proliferation rate comprise virulence-related phenotypic traits of *Neospora caninum*. *Veterinary Research*. 42 (41); 1-11.
- Regidor-Cerrillo, J., R. Diez -Fuertes, F., Garcia-Culebras, A., Moore, P.D...Ortega-Mora, L., M. (2013) Genetic Diversity and Geographic Population structure of Bovine *Neospora caninum* Determined by Microsatellites. *PLoS One* 8 (8): 1-12
- Reid, J., A., Wermont, J., S., Cotton, J., A...Wastling, M., J. (2012). Comparative Genomics of the Apicomplexa Parasites *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*: Coccidia Differing in Host Range and Transmission Strategy. *PLoS Pathog* 8(3): e1002567.
- Rodríguez, A. M., Maresca, S., Cano, D. B., Armendano, J. I., Combessies, G., Lopéz-Valiente, S., ... Campero, C. M. (2016). Frequency of *Neospora caninum* infections in beef cow – calf operations under extensive management. *Veterinary Parasitology*, 219, 40–43.
- Salehi, N., Gottstein, B., Haddadzadeh, H.R. (2015). Genetic diversity of bovine *Neospora caninum* determined by microsatellite markers. *Parasitol Int* 64(5):357-61
- Sawada, M., Kondo, H., Tomioka, Y., Park, C.H., Morita, T., Shimada, A., Umemura, T. (2000) Isolation of *Neospora caninum* from the brain of a naturally infected adult dairy cow. *Veterinary parasitology*. 90 (2000): 247-252
- Špilovská, S., Reiterová, K., Antolová, D. (2015). *Neospora caninum* - Associated Abortions in Slovak Dairy Farm. *Iranian journal of parasitology*, 10(1), 96–101.
- Stenlund, S., Bjorkman, Holmdahl, O.J.M., Kindahl, H., Ugglå, A. (1997). Characterization of a Swedish bovine isolate of *Neospora caninum*. *Parasitol Res*. 83, 214- 219.
- Tibayrenc M., Ayala F.J. (2012). Reproductive clonality of pathogens: a perspective on pathogenic viruses, bacteria, fungi and parasitic protozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(48): E3305–E3313

- Vargas, J. J., Cortés, J. A. (2001). *Neospora caninum*, ¿Una Zoonosis Potencial? Revista Salud Pública, 3(1), 89–93.
- Walton, J., K. (2008). *Neospora caninum*: Studies toward isolation in New Zealand (Master's Thesis of Veterinary Studies, Massey University, Palmerston North, New Zealand). Recuperado de <https://mro.massey.ac.nz/handle/10179/1089>. Fecha de consulta: 15, 02, 2017
- Wilson, J.D., Orsel, K., Waddington, J...Raverty, S.A. (2016). *Neospora caninum* is the leading cause of bovine fetal loss in British Columbia, Canada. Rev. Vet Parasitol. 218 (15) 46-51.
- Yamane, I., Kokuho, T., Shimura...Conrad, P.A., (1997). In vitro isolation and charaterisation of a bovine *Neospora* species in Japan. Res. Vet. Sci. 63, 77–80.
- Zambrano J, Cotrino V, Jiménez C, Romero M, Guerrero B. (2001). Evaluación serológica de *Neospora caninum* en bovinos en Colombia. Revista Acovez.26, 5-10
- Zhang, W., Deng, C., Liu, Q... Hu, D.M. (2007) First identification of *Neospora caninum* infection in aborted bovine fetuses in China. Veterinary Parasitology. 149 (1), 72-76.
- Jia, L., Zhang, S., Liu, M... Guo, H. (2014). Isolation, Identification, and Pathogenicity of *Neospora caninum* China Yanbian strain. Iranian J Parasitol. 9(3) 394-401.

