



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSIS BOVINA EN FETOS, POR
INMUNOHISTOQUÍMICA Y PCR DEL GEN pNc5 Y EL ITS-1

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA

FELIX DOMINGO SÁNCHEZ GODOY

TUTOR: ELIZABETH MORALES SALINAS
COMITÉ TUTORAL: VICTOR M. BANDA RUIZ
ALFREDO SAHAGÚN RUIZ

México D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A MI ESPOSA NOEMI QUE ES LA PERSONA MAS IMPORTANTE DE MI VIDA YA QUE SIN ELLA NO HABRIA PODIDO LOGRAR TODO MIS OBJETIVOS Y SOBRE TODO POR QUE ME HA DADO EL REGALO MAS IMPORTANTE DE MI VIDA A MI HIJA ANDREA.

A TI ANDREA QUE ERES LA LUZ QUE ME FALTABA

A MIS PADRES Y HERMANAS, QUE SIEMPRE ME HA APOYADO

AGRADECIMIENTOS

A LA DRA. ELIZABETH MORALES POR SU APOYO INCONDICIONAL Y SOBRE TODO POR SU AMISTAD.

AL DR ALFREDO SAHAGÚN Y VICTOR BANDA POR SU CONFIANZA Y APOYO.

AL DR NESTOR LEDESMA POR HABERME PERMITIDO LA REALIZACION DE ESTA TESIS EN EL DEPTO DE AVES Y POR SUS CONSEJOS Y AMISTAD.

A TODOS MIS PROFESORES Y COMPAÑEROS POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS.

AL TÉCNICO LUIS ANTONIO MORALES POR REALIZAR LOS CORTES HISTOLÓGICOS DE ESTÁ TESIS.

LISTA DE CONTENIDOS

	Página
LISTA DE CONTENIDOS	ii
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	iii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVOS	16
HIPÓTESIS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
RESULTADOS	26
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	29
REFERENCIAS	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Encéfalo de feto de bovino mostrando una zona de necrosis con agregados de células gliales. Tinción Hematoxilina y Eosina 400X
Página 48
- Figura 2. Encéfalo de feto de bovino que exhibe un quiste intraneuronal de *Neospora caninum* que conteniendo abundantes taquizoitos. Tinción Hematoxilina y Eosina 1000X
Página 48
- Figura 3. Encéfalo de feto de bovino que muestra inmunopositividad marcada en un quiste intraneuronal de *Neospora caninum*. Técnica IHQ (CAB-P 1000X)
Página 49
- Figura 4. Encéfalo de feto de bovino que exhibe inmunopositividad en taquizoitos de *Neospora caninum* que se encuentran al centro de una zona de necrosis y gliosis. Técnica IHQ (CAB-P 1000X)
Página 49
- Figura 5. Frecuencia de los 48 fetos que mostraron histopatología positiva y negativa
Página 50
- Figura 6. Lesiones microscópicas en encéfalo mas frecuentemente observadas en los fetos.
Página 50
- Figura 7. Número de fetos con histopatología positiva y su resultado inmunohistoquímico
Página 51
- Figura 8. PCR de Prolactina con los iniciadores HL033-HL035 mostrando amplificación de 156 pb con la extracción de DNA mediante el método casero y el reactivo comercial
Página 51
- Figura 9. Límite de detección de DNA en taquizoitos de *N.caninum* con los iniciadores PN1 y PN2 de la región ITS1
Página 52
- Figura 10. Límite de detección de DNA en taquizoitos de *N.caninum* con los iniciadores Np7-Np4 del gen pNc5, que amplifican una banda de 275 pb.

Figura 11. Detección por PCR de DNA de *Neospora caninum* en TFFIP, pertenecientes a los fetos abortados, con los iniciadores PN1-PN2 de la región ITS1

Figura 12. Detección por PCR de DNA de *N. caninum* en TFFIP, pertenecientes a los fetos abortados, con los iniciadores Np7-Np4 del gen pNc5

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación por grupos de los fetos con respecto a el resultado histopatológico (HP) e inmunohistoquímico (IHQ).

Página 54

Cuadro 2. Análisis estadístico utilizando tablas de contingencia de 2X2, para comparar la relación entre los resultados histopatológicos e inmunohistoquímicos.

Página 54

Cuadro 3. Relación de casos analizados por histopatología, inmunohistoquímica y PCR (pNc5 e ITS1)

Página 55

Cuadro 4. Frecuencia de fetos positivos por IHQ y PCR ITS1.

Página 56

Cuadro 5. Frecuencia de fetos positivos por IHQ y PCR pNc5.

Página 56

Cuadro 6. Frecuencia de fetos positivos utilizando PCR de ITS1 y pNc5

Página 57

Resumen

Sánchez Godoy Félix Domingo. Diagnóstico de neosporosis bovina en fetos por inmunohistoquímica y PCR del gen pNc5 y el ITS-1. (Tutores Dra Elizabeth Morales Salinas, Dr. Alfredo Sahagún Ruiz, Dr. Victor Manuel Banda Ruiz)

La neosporosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, que ocasiona aborto en bovinos. El diagnóstico definitivo depende de la identificación del parásito en los tejidos. El método más comúnmente aplicado es la técnica de inmunohistoquímica, y en los últimos años el PCR ha demostrado ser capaz de detectar DNA de este protozoo, basándose en la amplificación del gen pNc5 o el ITS1. El objetivo de este trabajo es determinar la utilidad del PCR para la detección específica de *Neospora caninum* en tejidos fetales de bovino fijados en formalina al 10% e incluidos en parafina, utilizando la región genómica pNc5 y el espaciador interno transcrito 1 (ITS1). Para lo cual se evaluaron 48 encéfalos de fetos de bovino, de los cuales 29 casos (60.4%) presentaron lesiones de neosporosis, caracterizadas por microgliosis y necrosis multifocal, 21 de estos 29 casos (72.41%) fueron positivos por inmunohistoquímica (IHQ), encontrando una asociación significativa ($p < 0.005$) y una concordancia de 0.83. Se encontraron 15 de los 29 casos (51.72%) positivos con el PCR para el gen ITS-1 y 12 (41.37%) para pNc5. La sensibilidad para ITS1 y pNc5 fue del 71.42% y del 57.14% respectivamente y la especificidad del 100% para ambas. No se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) en cuanto al número de fetos positivos por IHQ y PCR del ITS1, sin embargo cuando se comparó la IHQ con el PCR de pNc5, la inmunohistoquímica fue superior para detectar un mayor número de casos ($p > 0.05$). No se encontró diferencia estadística significativa entre la cantidad de fetos positivos por PCR utilizando pNc5 e ITS1. Los resultados que se encontraron en este estudio no muestran una diferencia en la utilización de la técnica de PCR (ITS1 e pNc5) o de inmunohistoquímica para detectar neosporosis en tejidos de fetos fijados en formalina e incluidos en parafina. Esto principalmente debido a características de la neosporosis como lo son distribución al azar y bajo número de parásitos en los tejidos, por lo cual se propone el empleo de la inmunohistoquímica, ya que en este estudio los dos métodos de PCR no lograron detectar un mayor número de casos positivos.

Abstract

Sánchez Godoy Felix Domingo. Diagnosis of Bovine Neosporosis in fetuses by immunohistochemistry and PCR of the pNc5 gene and the ITS-1. (Tutors: Dra. Elizabeth Morales Salinas, Dr. Alfredo Sahagún Ruíz and Dr. Victor Manuel Banda Ruíz).

Neosporosis is an infectious disease with a worldwide distribution and causes abortion in bovines. The definitive diagnosis depends of the identification of the parasites in the tissues. The methode that is more comon used is immunohistochemistry (IHQ), and in the last years the polimerase chain reaction (PCR) technique has demonstrated of beeing capable of detecting the DNA of this protozoa. This technique is based on the amplification of the pNc5 and ITS-1 genes. The objective of this study was to determine the utility of PCR for the specific detection of *Neospora caninum* in fetus tissues fixed in 10% neutral buffered formalin and embedded in paraffin wax, using the pNc5 genomic region and the internal transcribed spacer 1 (ITS-1). For this study, 48 brains of bovine fetus were evaluated. Twenty nine of these cases (60.4%) showed neosporosis lesions, caracterizated by microgiosis and multifocal necrosis, 21 of the 29 cases (72.41%) were positive by IHQ finding a significant asociation ($p < 0.005$) and a concordance of 0.83. Fifteen of 29 cases (51.72%) were positive by PCR using the ITS-1 gene and 12 cases (41.37%) for pNc5. The sensibility for both genes were of 71.42% and of 57.14%, respectively and the specificity of 100% in both. There was no significant statistical diference ($p > 0.05$) between the number of positive fetus analyzed by IHQ and the ITS-1 PCR, nevertheless, when the IHQ was compared with the pNc5 PCR, this technique detected more cases positives ($p > 0.05$). There was no statistical significant difference between the positive PCR fetuses using pNc5 and ITS-1. It was concluded that there were not differences by using the PCR (ITS-1 and pNc5) and the IHQ for detecting fetuses with neosporosis. This principally due to characteristics of neosporosis, such as random distribution and low number of parasites into the tissues, thus the employment of IHQ is proposed since according to the results of this study, both PCR methods did not detected more positives cases than the IHQ.

Introducción

La neosporosis es una enfermedad infecciosa de distribución mundial, que ocasiona aborto en bovinos y que afecta de forma natural otras especies como perros, caballos, ovejas, cabras y ciervos.^{1,2,3} El agente etiológico es *Neospora caninum* es un protozoo del phylum Apicomplexa y de la familia *Sarcocystidae*, semejante por microscopia de luz a *Toxoplasma gondii* pero diferente a éste ultraestructural y antigénicamente.⁴ La infección por *Neospora caninum* no es nueva ya que en estudios retrospectivos se ha encontrado en perros desde 1957.⁵ En bovinos la enfermedad se caracteriza por provocar aborto entre el quinto y sexto mes de gestación o el nacimiento de becerros muertos o vivos pero crónicamente infectados.²

Historia

En 1984 Bjerkas *et al.*, informaron una enfermedad parecida a neosporosis en perros bóxer de Noruega.^{6, 7} Estos perros desarrollaron encefalitis y miositis entre los 2 y 6 meses después del nacimiento, protozoarios semejantes a *T. gondii* fueron encontrados en encéfalo y músculo; Sin embargo, no se encontraron anticuerpos contra *T. gondii* en el suero de estos perros. En 1988 Dubey *et al.*, en Estados Unidos, observaron un parásito similar en 10 perros el cual fue nombrado *Neospora caninum*.⁸ Posteriormente los taquizoitos de *N. caninum* fueron aislados en cultivos de células y se observaron quistes en ratones inoculados con tejidos de perros naturalmente infectados.⁹ En 1989 el desarrollo de la técnica de inmunohistoquímica permitió identificar al parásito en tejidos de una amplia variedad de animales.¹⁰ En 1991 se compararon los parásitos encontrados en Noruega y Estados Unidos concluyendo que es el mismo protozoo.⁷ En la década de los noventa la neosporosis fue reconocida como una causa importante de aborto en bovinos en todo el mundo.¹¹ En 1998 se demostró que el perro es un huésped definitivo de *N. caninum*.¹² Recientemente se informó que los coyotes (*Canis latrans*) también son huéspedes definitivos.¹³

Morfología

Hasta el momento sólo se han reconocido dos estadios asexuales: taquizoitos y bradizoitos. Los taquizoitos son ovoides, con forma de media luna y miden 3 X 7 X 1 a 5 μm dependiendo de su estado de división.^{14,15} Los taquizoitos se dividen en dos por endodiogenia y pueden encontrarse hasta 100 en una célula. En perros y bovinos afectados los taquizoitos pueden encontrarse en células neuronales, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos, células epiteliales de los túbulos renales y hepatocitos.⁴ Los quistes son redondos a ovoides y miden hasta 107 μm de diámetro. La pared del quiste es lisa y mide 4 μm de grosor.^{14,16,17} Estos quistes contienen bradizoitos que miden 6 a 8 X 1 a 1.8 μm .¹⁸ Hasta ahora no se conoce la estructura y localización de las fases sexuales del protozoo que originan los ooquistes en el intestino del huésped definitivo. Los ooquistes esporulados son esféricos a subesféricos y miden 11.7 X 11.3 μm . Presentan dos esporoquistes en cada ooquistes. Los esporoquistes son elipsoidales, miden 8.4 X 6.1 μm y contienen cuatro esporozoitos cada uno. Los esporozoitos son alargados y miden 7 X 8 X 2 a 3 μm .⁴

Ciclo Biológico

El ciclo de vida es similar al de *T. gondii*. Los huéspedes definitivos son el perro y el coyote (*Canis latrans*),^{12,13} aunque el perro también puede actuar como huésped intermediario. Los ooquistes se excretan a través de las heces de los huéspedes definitivos y en condiciones ideales de humedad y temperatura esporulan formando la fase infectante, los ooquistes esporulados que al ser consumidos por algún huésped intermediario como lo pueden ser los rumiantes, équidos y animales silvestres, liberan los esporozoitos, los cuales infectan el intestino delgado, se dividen por endodiogenia formando a los taquizoitos e infectan músculo esquelético, cardíaco, tejido conjuntivo y nervioso, ahí se multiplican y dan lugar a un gran número de quistes que contienen bradizoitos, que son la forma de división lenta del parásito. Los taquizoitos y bradizoitos son las fases infectantes de los huéspedes definitivos. Los quistes sólo se han encontrado en sistema nervioso central, nervios periféricos y en el ojo.^{19, 20}

Transmisión

El modo de transmisión en el huésped definitivo es vertical de madre a hijo a través de varias generaciones y horizontal por la ingestión de carne, fetos o placentas que contengan quistes o taquizoitos de *N. Caninum*, o por consumir ooquistes esporulados provenientes de otro huésped definitivo.^{12, 19,21} El periodo de prepatencia es de 5 días o más después de que consume los quistes o taquizoitos. En los huéspedes intermediarios la transmisión puede ser horizontal al consumir los ooquistes esporulados que pueden estar contaminando agua o alimento; sin embargo, la transmisión vertical es más frecuente, la cual se origina al romperse los quistes y los taquizoitos presentes en los tejidos de las vacas, pueden llegar al feto. Esto se puede repetir por varias generaciones.

Patogenia

Neospora caninum causa muerte celular por multiplicación activa de taquizoitos, es capaz de producir lesiones necróticas en pocos días y es un patógeno primario debido a que en perros y bovinos infectados, en la mayoría de los casos, no se encuentran otros agentes involucrados.⁹

Signos clínicos

Sólo se observan en becerros jóvenes menores de 2 meses de edad, infectados intrauterinamente. El aborto es el único signo clínico observado en vacas adultas, que pueden abortar desde los tres meses de gestación hasta término. Muchos de los abortos inducidos por *N. caninum* ocurren entre el 5^o y 6^o mes de gestación. Los fetos pueden morir en el útero, ser reabsorbidos, momificados, autolisados, nacer muertos; o bien nacer vivos pero crónicamente infectados.² Dentro del hato los abortos pueden ser endémicos o epidémicos.^{2,11,22} Vacas positivas a anticuerpos anti-*N. caninum* son más propensas a abortar que las vacas seronegativas.^{23,24,25,26} Becerros infectados con *N. caninum* pueden nacer bajos de peso, con signos neurológicos tales como: flexión o hiperextensión de miembros

torácicos o pélvicos, ataxia, decremento de los reflejos patelares, pérdida de la propiocepción, exoftalmia y asimetría de los ojos.²

Relación hospedador-parásito

La neosporosis es una enfermedad que se manifiesta durante la preñez, en donde el feto es particularmente susceptible. Los signos clínicos son raramente observados en vacas no preñadas con excepción de algunos becerros infectados congénitamente que muestran daño neurológico e hiperextensión de miembros.¹ *N. caninum* como otros parásitos apicomplexa es un patógeno intracelular obligado. Esto sugiere que la respuesta inmune mediada por células sea importante en la protección contra el parásito. Se ha observado que en células infectadas con taquizoitos de *N. caninum* y tratadas con IFN- γ , se disminuye la multiplicación del parásito.²⁷ Adicionalmente el IFN- γ y el TNF- α inhiben la multiplicación del protozooario en cultivos primarios de células nerviosas de bovino.²⁸ También se ha demostrado la proliferación de células antígeno específicas y productoras de IFN- γ en ganado infectado de forma natural y experimental con *N. caninum*.^{29,30} Trabajos con ratones demostraron la importancia de las citocinas IFN- γ e IL-12 en el control de la infección ya que ratones tratados con anticuerpos neutralizantes contra estas citocinas, los hacen más susceptibles a neosporosis.³¹ Por lo cual se propone que estas citocinas pro-inflamatorias relacionadas con una respuesta Th1 pueden ser importantes en la inmunidad protectora contra la infección. La preñez plantea un problema interesante para el sistema inmune de la madre. Se menciona que la respuesta inmunológica en la placenta es de tipo Th2 con la producción de citocinas IL-10, IL-4 y TGF- β y estas causan una regulación negativa de Th1 con la consecuente disminución de citocinas pro-inflamatorias como IL-12 y IFN- γ . Por lo tanto la respuesta Th2 en la placenta favorece la multiplicación del parásito y el aborto.^{32,33} Por otro lado los anticuerpos contra *N. caninum* en vacas preñadas fluctúan durante la gestación. El título de anticuerpos es un indicador indirecto de la exposición del antígeno (taquizoitos) al sistema inmune y un incremento en el título de anticuerpos puede indicar la actividad del parásito y su multiplicación en

el hospedador. La habilidad del ganado infectado con *N. caninum* para inducir una respuesta inmune basada en proliferación celular antígeno específico y la producción de IFN- γ se disminuye alrededor de la mitad de la gestación y concuerda con la alta frecuencia de abortos que ocurren en este periodo (4-7 meses).³⁴ La progesterona favorece una respuesta inmune Th2 que se va incrementando durante la gestación.³⁵ Esta regulación negativa de Th1 y por lo tanto de IFN- γ e IL-12 puede contribuir a la reactivación de la infección de *N. caninum* en animales persistentemente infectados. El riesgo de transmisión de *N. caninum* de la madre infectada al feto está relacionado con la edad gestacional. En un estudio con vacas preñadas e infectadas con taquizoitos por vía intravenosa se encontró un 83% de probabilidad de transmisión a las 10 semanas de gestación y 100% de probabilidad a las 20 semanas. Utilizando la vía subcutánea la transmisión fue del 50% a las 10 semanas y del 100% a las 20 semanas de gestación. Evidencias en ganado infectado naturalmente sugieren que animales infectados antes de la preñez presentan un riesgo menor de aborto temprano, pero este se incrementa si la infección ocurre después del día 90 de gestación.^{34,36,37}

Diagnóstico

Desde el descubrimiento de *Neospora caninum*, muchas pruebas diagnósticas han sido desarrolladas para ayudar a detectar esta infección. Estas pruebas incluyen Inmunohistoquímica (IHQ), Inmunofluorescencia indirecta (IFAT), Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA), Aglutinación Directa (DAT), Análisis de Wester blot (WB) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

1. Métodos de diagnóstico indirectos

Se basan en la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en suero, líquido cefalorraquídeo o de cavidades serosas de fetos. En las pruebas serológicas los valores de los títulos y la absorbancia son dependientes de la composición del

antígeno, del anticuerpo secundario y otros componentes, por lo tanto el punto de corte puede ser seleccionado arbitrariamente, lo que determina una sensibilidad y una especificidad para una aplicación particular. La edad de los animales puede afectar la selección del punto de corte. La presencia de anticuerpos específicos en suero de las vacas que abortan es indicativo únicamente de exposición a *Neospora caninum*.

1.1 Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se ha utilizado con éxito para detectar anticuerpos anti-*N. caninum*; algunos de los métodos que se han desarrollado incluyen ELISA indirecta, ELISA-competitiva y ELISA-iscom.^{38,39} La ELISA indirecta (ELISA-i) utiliza antígenos crudos derivados de los taquizoitos de *Neospora caninum*. La sensibilidad y especificidad es de 95-100% y del 99.7-100% respectivamente. Esta prueba es la base para las pruebas comerciales Hercheck Anti-*Neospora* (laboratorios IDEXX) y Chekit anti-*Neospora* (laboratorios Dr. Bommeli/Intervet). El punto de corte para ambas técnicas es de 0.50. La prueba de ELISA competitiva (ELISA-c) detecta anticuerpos anti-*N. caninum* en bovinos y cabras. Se basa en la competencia entre anticuerpos anti-*N. caninum* presentes en el suero de animales sospechosos y anticuerpos monoclonales anti-*N. caninum* marcados con peroxidasa incluidos en el reactivo de diagnóstico, los cuales se unen a los antígenos de *N. caninum* presentes en las placas. Porcentajes de inhibición mayores o iguales al 30% indican exposición al parásito. La principal ventaja de esta prueba es que no provoca reacción cruzada con antígenos de otros parásitos apicomplexa (*Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis*). Tiene una sensibilidad del 97.6% y una especificidad de 98.6% (Laboratorios VMRD).³⁹ La ELISA-iscom utiliza proteínas de membrana de taquizoitos incorporadas a un complejo inmunoestimulante y esta puede aplicarse en rumiantes y perros. Presenta una sensibilidad del 99.5% y una especificidad del 92%.⁴⁰ Otro método es la ELISA por avidéz de IgG, que se basa en que la avidéz de IgG se incrementa con el tiempo de la infección, consecuentemente avidéz

menor a 50 indica infección aguda y avidez mayor a 50 indica un curso crónico. La ventaja es que puede ser usada para diferenciar una infección aguda o crónica.⁴¹

1.2 Inmunofluorescencia indirecta

La prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) se considera la más específica y se puede aplicar para el diagnóstico de neosporosis en rumiantes, perros y fauna silvestre, sin tener reacción cruzada o ser mínima con anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii*, y nula con *Cryptosporidium parvum*. Títulos de anticuerpos de 1:200 a 1: 640 pueden indicar infección en ganado adulto. Para fetos de bovino y becerros precalostrados títulos bajos como 1:80 son sugerentes de infección. Para becerras de una semana de edad y calostradas, puntos de corte $\geq 1:5120$ han sido un buen indicador para el diagnóstico temprano de vaquillas seropositivas.⁴² Sin embargo, la prueba de IFAT es cara y tardada comparada con la ELISA; por lo tanto no es usada rutinariamente para la búsqueda de anticuerpos anti-*N. caninum* en el hato, ni para estudios epidemiológicos.

1.3 Aglutinación directa

La prueba de Aglutinación directa para *Neospora* (DAT), es simple de usar, no requiere anticuerpos secundarios específicos de especie y se puede utilizar para el diagnóstico de varias especies animales. Bovinos con títulos de anticuerpos 1:40 se consideran seropositivos. Esta prueba exhibe una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90.4%. No tiene reacción cruzada con parásitos apicomplexa y con otros agentes virales o bacterianos involucrados en el aborto de ganado bovino.⁴³

1.4 Interpretación

Todas las pruebas serológicas deber ser interpretadas con cautela debido a que el sistema inmune no es estático y el nivel de anticuerpos fluctúa particularmente para parásitos que forman quistes que pueden no ser percibidos por el sistema inmune del hospedador y reactivarse con la inmunosupresión. El resultado

serológico de un solo animal no refleja el estatus de la infección, particularmente en hatos con historia de abortos por *N. caninum*. Por ejemplo vaquillas congénitamente infectadas que tienen títulos positivos a *N. caninum*, han tenido títulos negativos cuando parén becerros infectados congénitamente. De manera similar vacas que abortan por neosporosis su feto no presenta títulos elevados de anticuerpos contra este parásito. La detección de anticuerpos anti-*N. caninum* en el suero de vacas que abortan toma por lo menos dos semanas después del aborto. El feto bovino desarrolla la habilidad de producir anticuerpos durante el 5^{to} mes de gestación. El encontrar anticuerpos anti-*N. caninum* en suero fetal, líquido de cavidades corporales o en becerros precalostrados indica infección, pero un resultado negativo no descarta esta posibilidad debido a que la síntesis de anticuerpos es dependiente de la edad de gestación, nivel de exposición y en tiempo entre la infección y el aborto. La sensibilidad para la serología fetal varía de 50-84%.

2. Métodos de diagnóstico directos

Se basan en la identificación del parásito y las lesiones provocadas por éste en los tejidos afectados, llegando al diagnóstico definitivo de neosporosis.

2.1 Histopatología

El examen histopatológico de los tejidos fetales es esencial para el diagnóstico de neosporosis, ya que se pueden detectar lesiones características del parásito tales como: encefalitis necrótica con microgliosis, hepatitis y miocarditis no supurativa. En algunos casos es posible detectar en el examen histológico tanto los taquizoitos como los quistes conteniendo los bradizoitos. La sensibilidad y la especificidad de la histopatología fetal son altas. Un diagnóstico presuntivo puede ser hecho tomando como base la presencia de las lesiones histopatológicas antes descritas. Sin embargo, debido a que *N. caninum* es estructuralmente semejante a *T. gondii*, es recomendable emplear técnicas más sensibles como la inmunohistoquímica (IHQ) utilizando anticuerpos específicos anti-*N. caninum* para llegar al diagnóstico etiológico.^{1,2,8}

2.2 Inmunohistoquímica

El diagnóstico etiológico de la infección por *Neospora caninum* depende de la identificación del parásito en los tejidos. El método más comúnmente aplicado para demostrar a *Neospora* en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina es la técnica de inmunohistoquímica con el método de detección del Complejo Streptoavidina-Biotina-Peroxidasa (CABP).^{44,45} Esta técnica utiliza un anticuerpo primario policlonal de origen caprino y la ventaja de este método es que la presencia del parásito puede ser relacionado con las lesiones; sin embargo, este método es laborioso y relativamente poco sensible. La capacidad de la prueba para detectar quistes o taquizoitos de *Neospora caninum* depende del órgano utilizado y el número de cortes histológicos examinados.

2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR, utilizando diferentes iniciadores, es capaz de detectar DNA de *Neospora caninum* en tejidos, líquido cefalorraquídeo y heces de los animales infectados y se basa principalmente en la amplificación específica de un segmento de la región genómica pNc5 y el ITS1.^{46,47} La región del ITS1 del DNA ribosomal, es usada para estudios filogenéticos y es una zona ideal para el desarrollo de PCRs, debido a que está presente en un alto número de copias, exhibe variabilidad intergenero y es altamente conservada entre especies. Su localización entre genes del ARN ribosomal le permite ser conservada y ser fácilmente amplificada y secuenciada⁴⁷. Holmdahl y Mattsson⁴⁸ informaron el uso del PCR para la detección de DNA de *Neospora caninum*, para lo cual secuenciaron el ITS1 y designaron un par de iniciadores (PN1-PN2) que amplificaban un fragmento de 279 pares de bases (pb) con sensibilidad de al menos 5 taquizoitos y no se observan amplificaciones con otros parásitos apicomplexa como *Toxoplasma gondii* y *Sarcocystis* sp. Se ha informado una nueva especie de *Neospora* en caballos, y fue nombrado *Neospora hughesi* basado en parte a las diferencias en nucleótidos observadas en el ITS.⁴⁹ Yamage *et al.*,⁵⁰ describieron el gen pNc5, que es multicopia, ausente del genoma de *Toxoplasma gondii*,

Sarcocystis y *Hammondia* sp y diseñaron 5 iniciadores sentido (Np1, Np3, Np5, Np7 y Np21) y cuatro contrasentido (Np2, Np4, Np6 y Np28), de estos iniciadores probaron con 19 combinaciones encontrando que las combinaciones Np21-Np6, Np21-Np4 y Np7-Np4 generan una banda específica de *Neospora caninum* en presencia de al menos 10 pg de DNA parasitario.

La falta de una prueba de oro para realizar el diagnóstico de neosporosis implica la necesidad de realizar más de dos técnicas diagnósticas para detectar al protozooario. Por lo cual se sugiere utilizar pruebas serológicas de tamiz (ELISA) a las madres y sus becerros precalostrados, así como analizar a los fetos abortados a través de la histopatología e inmunohistoquímica para definir el estado de la enfermedad en el hato.

Neosporosis en fauna silvestre

Se han confirmado pocos casos de neosporosis en fauna silvestre; sin embargo, anticuerpos anti-*N. caninum* están presentes en el suero de muchas especies de mamíferos silvestres, lo que sugiere que el parásito puede estar distribuido ampliamente entre éstos.⁵¹ Se han informado infecciones naturales por *Neospora caninum* en diferentes especies de venados silvestres y en cautiverio. Se ha informado una seroprevalencia (40 y 50%) de *N. caninum* en venados cola blanca en Estados Unidos se ha informado entre lo que podría indicar que el venado juega un papel importante en la epidemiología de la neosporosis.⁵²

Gondim *et al.*, informó que los coyotes (*Canis latrans*) pueden eliminar ooquistes de *N. caninum* en sus heces, después de la ingestión de quistes parasitarios de *N. caninum* presentes en tejidos de becerros, lo que prueba que los coyotes son huéspedes definitivos de este parásito.⁵³ Este mismo investigador también ha documentado la eliminación de ooquistes de *N. caninum* por perros que fueron alimentados con tejidos de venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) con aislamientos positivos a *Neospora caninum*, lo que demuestra que el venado cola blanca es un verdadero huésped intermediario de *N. caninum*. Vianna *et al.*,

informan que la secuencia de ADN para el gen ITS1 y un fragmento del gen Nc5 de tres aislamiento de *Neospora caninum* en venados cola blanca, fueron idénticos a las secuencias publicadas para *N. caninum* en bases de datos. Estos hallazgos moleculares sugieren que el parásito en el ciclo doméstico vaca-perro es el mismo al que participa en el ciclo de los animales silvestres (venado cola blanca-coyotes).^{53,54,55}

El aislamiento de *Neospora caninum* en fauna silvestre ó en venados cola blanca y la evidencia serológica entre estos, así como la demostración de que el parásito puede interactuar entre animales domésticos y silvestres sugiere la importancia de la transmisión de *Neospora caninum* entre éstos últimos y el ganado.

Impacto económico

No hay datos contundentes sobre las pérdidas económicas debidas a neosporosis en ganado lechero. Sin embargo, los datos disponibles indican que alrededor del 20% de todos los abortos en Estados Unidos y Holanda, y el 12% en Bélgica e Inglaterra se asocian a *N. caninum*. Se estima que en California 40 000 abortos son debidos a neosporosis, lo que ocasiona pérdidas económicas de 35 millones de dólares por año. En Australia y Nueva Zelanda las pérdidas se estiman en 100 millones de dólares por año. Adicionalmente a los costos directos que involucran la pérdida de fetos, también se deben tomar en cuenta los costos indirectos, que incluyen servicios profesionales y de diagnóstico, pérdidas en la producción de leche y eliminación de vacas por problemas reproductivos.^{56,57,58,59,60}

Situación en México

El primer reporte de aborto asociado a neosporosis bovina en México, se realizó en seis fetos de un hato de 800 vacas en el Noreste del país aunque *Neospora caninum* fue confundido con *Hammondia pardalis*.⁶¹ Posteriormente fueron informados fetos con lesiones compatibles con neosporosis en Torreón Coahuila.⁶² Morales *et al.*, publicaron el primer informe de aborto bovino por *Neospora caninum* por medio de histopatología e inmunohistoquímica. En un estudio mas

amplio analizando 211 fetos de las principales cuencas lecheras, se encontraron lesiones características de neosporosis en 73 fetos (35%), 41 tejidos de estos fetos fueron positivos por IHQ.⁶³ En una encuesta serológica en hatos lecheros mexicanos entre 1997 y 1999, se observó una seroprevalencia del 72% en hatos con aborto epidémico y del 36% en hatos con aborto endémico.²⁶ Otro estudio serológico realizado por García *et al.*, en Aguascalientes, informó que de 187 animales de 13 hatos, el 59% fueron seropositivos.⁶⁴ Sánchez *et al.*, realizaron el primer estudio serológico de neosporosis en perros de México, comparando la seropositividad entre perros de ciudad y de establo, y en vacas de establos con y sin perros, observando que la seropositividad fue mayor en perros de establo (51.85%) con respecto a los de ciudad (20%) y la seropositividad en vacas fue mayor en establos con perros (58.52%), que sin ellos (35.83%).⁶⁵ Medina *et al.*, realizaron un estudio en Aguascalientes, con 44 de fetos de bovino, de los cuales 35 (80%) fueron positivos a neosporosis utilizando PCR anidado y 20 (45%) fueron considerados positivos por histopatología. La concordancia entre ambas pruebas fue del 31%.⁶⁶ Todos estos estudios demuestran que la enfermedad está ampliamente difundida en los hatos lecheros mexicanos y que los perros pueden estar involucrados en la transmisión del parásito.

Justificación

Debido a la frecuencia de abortos en bovinos, en los cuales no se logra identificar al agente etiológico, es imperativo la adecuación y desarrollo de técnicas más sensibles que permitan establecer un diagnóstico etiológico preciso. Por este motivo se propone el empleo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para aumentar la sensibilidad y especificidad en la detección de *Neospora caninum* en los tejidos de fetos abortados, ya que esta parasitosis actualmente se considera una de las principales causas de aborto bovino.

Objetivos

Objetivo General

Determinar la utilidad del PCR comparada con la inmunohistoquímica, para la detección específica de *Neospora caninum* en tejidos fetales de bovino fijados en formalina e incluidos en parafina, utilizando el gen pNc5 y el espaciador interno transcrito 1 (ITS1).

Objetivos Particulares

1. Adecuar la técnica de PCR utilizando el gen pNc5 y el ITS1, para la detección de DNA de *Neospora caninum* en encéfalos de fetos de bovino fijados en formalina e incluidos en parafina, previamente analizados por histopatología e inmunohistoquímica
2. Comparar la sensibilidad y especificidad de ambos métodos de PCR (pNc5 e ITS1), para la detección de DNA de *Neospora caninum* en encéfalos de fetos de bovino fijados en formalina e incluidos en parafina.
- 3.- Comparar el número de fetos positivos a neosporosis bovina por inmunohistoquímica y PCR del gen pNc5 e ITS-1

Hipótesis

1. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen pNc5 y el ITS1 será más específico y más sensible que la inmunohistoquímica, para demostrar casos positivos a *Neospora caninum* en tejidos fetales de bovino, fijados en formalina e incluidos en parafina.

2. El PCR del ITS1 será más eficiente en la detección de DNA de *Neospora caninum* en tejidos fetales de bovino, que el PCR del gen pNc5.

Material y Métodos

1.- Obtención de muestras

Se obtuvieron 48 casos de fetos abortados de vacas lecheras, de los cuales se tomó solamente el encéfalo, que se había fijado en formalina e incluido en parafina y que formaban parte del acervo de diagnóstico del Departamento de Patología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y que fueron remitidos durante el periodo 1998-2004.

2.- Diseño del Experimento

Se formaron tres grupos de animales, con base en el resultado del estudio histopatológico e inmunohistoquímico encontrado en encéfalo:

Grupo 1

Verdaderamente positivos, fetos con histopatología e inmunohistoquímica positiva.

Grupo 2

Verdaderamente negativos, fetos con histopatología e inmunohistoquímica negativa.

Grupo 3

Fetos con histopatología positiva e inmunohistoquímica negativa.

Los cambios histológicos que se tomaron en cuenta para considerarse positivos a *Neospora caninum* fueron: encefalitis no supurativa, microgliosis y/o necrosis multifocal así como la presencia de parásitos (Figuras 1 y 2). Para considerar a un feto positivo por inmunohistoquímica, se observaron quistes o taquizoitos de *Neospora caninum* que se tiñeron de color café rojo, a la periferia o dentro de las lesiones histopatológicas (Figuras 3 y 4).

3.- Histopatología

Se realizó un corte de encéfalo de 4-5 μm de grosor con micrótomo estándar de cada caso. Posteriormente se realizó la tinción de Hematoxilina y Eosina y se procedió a la evaluación histológica para determinar la presencia de lesiones o de estructuras parasitarias.

4.- Inmunohistoquímica

Para identificar taquizoitos o quistes de *Neospora caninum* presentes en encéfalo de los fetos de bovino se utilizó la técnica de Inmunohistoquímica con el método de detección Complejo Estreptoavidina-Biotina-Peroxidasa (CAB-P).

4.1 Tejidos utilizados como testigos

Testigo positivo.

Se utilizó una sección de encéfalo de feto de bovino, al cual se le demostró previamente la presencia de quistes y taquizoitos de *Neospora caninum* por inmunohistoquímica.

Testigo negativo.

Como testigos negativos se utilizaron cortes de los mismos encéfalos en los cuales se sustituyó el anticuerpo primario por amortiguador Tris 0.05 M, pH 7.6.

4.2 Procesamiento del tejido.

De cada caso previamente analizado por histopatología, se realizaron 3 cortes seriados de 3-5 μm de grosor utilizando un microtomo estándar. Se colocaron en laminillas tratadas previamente con Poli-L-lisina^a al 3% diluida en acetona. Posteriormente se desparafinaron por una hora a 60°C y se realizaron dos lavados con xilol de 10 minutos cada uno.

4.3 Inhibición de la peroxidasa endógena

^a Sigma Chemical Company. P.O. Box 14508. St. Louis Missouri. USA 63178-0016

Para inhibir la peroxidasa endógena, los tejidos se trataron con una solución de peróxido de hidrógeno al 30%^b y metanol absoluto a una relación de 1:8, durante 5 minutos a temperatura ambiente.

4.4 Hidratación de tejidos

Los tejidos fueron rehidratados con etanol a diferentes concentraciones (96%, 80%, 70%) y agua destilada haciendo lavados de 3 minutos cada uno.

4.5 Recuperación antigénica

Para la recuperación de antígenos, los tejidos se trataron con Pronasa^c al 0.1% por 10 minutos a 37°C. Inmediatamente después se realizó un lavado con agua destilada y amortiguador Tris 0.05 M, pH 7.6 por 5 minutos.

4.6 Bloqueos de avidina y biotina endógenas

Para bloquear la avidina y la biotina endógenas en los tejidos, se utilizó la solución bloqueadora de avidina y biotina^d. La cantidad utilizada para cada una de ellas fue de 20µL incubándose a 37°C en cámara húmeda por 15 minutos, entre cada solución se realizó un lavado con amortiguador Tris 0.05 M, pH 7.6 por 5 minutos.

4.7 Bloqueo con suero de conejo.

Para bloquear la adherencia no específica por parte del anticuerpo primario y secundarios se utilizó suero de conejo no inmune^e al 5%, aplicando 50µL sobre los tejidos, dejándolo incubar por 20 minutos en cámara húmeda a 37°C. En este caso solo se retiró el exceso sin realizar lavados.

4.8 Aplicación de anticuerpo primario

^b JT Baker Catalogo 218601

^c Sigma-Aldrich. P.O. Box 14508 St. Louis M.O. 63178 USA

^d ZYMED. Cat. 95-6543B. San Francisco California USA.

^e Sigma-Aldrich. P.O. Box 14508 St. Louis M.O. 63178 USA

Se utilizaron 50µL de anticuerpo primario policlonal^f anti-*Neospora caninum* a una dilución de 1/1000 hecho en cabra diluido en amortiguador Tris 0.05 M, pH 7.6. Posteriormente las laminillas se incubaron durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Después de esta incubación los tejidos fueron sometidos a 1 lavado con amortiguador Tris 0.05 M, pH 7.6 por 5 minutos.

4.9 Aplicación de anticuerpo secundario

Se aplicaron 50µL de anticuerpo secundario biotinilado conejo anti-cabra^g. Las laminillas se incubaron durante 20 minutos en cámara húmeda a 37°C. Transcurrido este tiempo se realizó un lavado con amortiguador Tris 0.05 M, pH 7.6 por 5 minutos.

4.10 Aplicación de la Estreptoavidina

Se aplicaron 20µL de estreptoavidina^h y se dejó incubar durante 20 minutos en cámara húmeda a 37°C, también se realizó un lavado con amortiguador Tris 0.05 M, pH 7.6 por 5 minutos.

4.11 Revelado

Para determinar la presencia o ausencia de antígeno en los tejidos se utilizó un reactivo comercial de reveladoⁱ que consta de cromógeno (aminoetilcarbazol), amortiguador para la reacción y peróxido de hidrógeno al 0.6%, el cual se preparó colocando una gota de cada uno de los reactivos en un mL de agua destilada. A cada tejido se le aplicaron 50µL de esta mezcla durante 5 a 6 minutos. Para detener la reacción, las laminillas se colocaron en agua destilada durante 5 minutos.

4.12 Tinción con Hematoxilina de Meyer

^f VMRD, Inc. PO Box 502 Pullman, WA 99163 USA

^g BIOCARE MEDICAL 2940 Camino Diablo, Suite 300, Walnut Creek, CA 94597

^{h,i,j} ZYMED San Francisco California USA

Para contrastar la coloración obtenida con el cromógeno se utilizó hematoxilina de Meyer^j aplicando 40µL durante 4 minutos. Finalmente a los tejidos se les colocó un cubreobjetos sellado con resina acuosa.

4.13 Interpretación de resultados

Los tejidos se consideraron inmunopositivos al detectar quistes o taquizoitos intra o extralesionales de color café rojizo en encéfalo.

5.- Extracción del DNA con método comercial

El DNA genómico fue obtenido de los encéfalos fijados en formalina e incluidos en parafina con el reactivo comercial QIAamp DNA miniKit^k siguiendo las indicaciones del fabricante, excepto por algunas modificaciones. Se realizaron dos cortes de 10 µm de grosor con un micrótopo estándar. Los tejidos se depositaron en tubos eppendorf de 1.5 ml y el proceso de desparafinación con calor, xilol y etanol fue eliminado. Posteriormente se agregaron 180 µl de Buffer ATL calentado en termoblok^l a 98°C por 20 minutos. Después se agregaron 30 µl de solución de proteinasa K y la mezcla se incubó por 50 minutos a 68°C en termoblock. Se colocaron 200 µl de etanol y la mezcla fue transferida al QIAamp Spin Column del reactivo, el resto de los pasos fueron semejantes a lo que sugiere el proveedor.

6.- Extracción del DNA con método no comercial

Se realizaron dos cortes de tejido de 10 µm de grosor, los cuales se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. Para el desparafinado se agregaron 100 µl de xilol y etanol al 100%, se mezclaron y centrifugaron^m a 12 000 RPM por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla de tejido en baño seco por 20 minutos a 55°C. El tejido fue resuspendido en 400 µl de Tris-HCL 50 mM pH 8.3, se le agregaron 50 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó toda la noche en baño Mariaⁿ a 37°C .

^k QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden Tel: +49-2103-29-0

^l Fisher Scientific Dry Bath Incubator USA

^m Sorvall Biofuge Fresco Kendro Laboratory Products

ⁿ Multitemp III Pharmacia Biotech

Posteriormente el tejido se colocó en baño seco a 95°C por 10 minutos, pasado ese tiempo se realizó la purificación de DNA por medio de fenol-cloroformo y alcohol isoamílico, y se precipitó el DNA por medio de etanol al 100% e incubación a -20°C por 48 hrs. El DNA se hidrató con agua destilada estéril y calentamiento en baño seco a 55-60°C por 10-15 minutos, el DNA obtenido fue almacenado a -20°C hasta su uso.

7.- Análisis por PCR del gen de prolactina usado como control de calidad de la extracción de DNA

El DNA obtenido de ambos métodos fue analizado por PCR, utilizado los iniciadores HL033 (CGAGTCCTTATGAGCTTGATTCTT) y HL035 (GCCTTCCAGAAGTCGTTTGTTC)^o para amplificar un fragmento de 156 pares de bases del gen de prolactina el cual se expresa constitutivamente en células de bovino y con esto comprobar la calidad del DNA obtenido por ambos métodos de los encéfalos fijados en formol e incluidos en parafina.

8.- Desarrollo del PCR de *Neospora caninum*

Para la región genómica pNc5 de *Neospora caninum*, se utilizaran los iniciadores Np7 sentido (5'-GGGTGAACCGAGGGAGTTG-3') y Np4 contrasentido (5'-CCTCCCAATGCGAACGAAA-3')^p, que amplifica un fragmento de 275 pares de bases. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: la mezcla maestra de 50 µl contiene, 5 µl de DNA, 21 µl de agua estéril, 5 µl de Buffer Taq (NH₄)₂SO₄ (10X), 1 µl dNTP's mix (10mM), 5 µl de cada iniciador (10 µM), 2 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl Taq DNA polimerasa (5U/µl) y 5 µl de solución de Enhancer^q. El PCR inicia con un ciclo de desnaturalización de 95°C por 5 minutos y 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos^f. Se tomaron 15 µl del producto amplificado que fueron cargados en un

^{o,p} SIGMA GENOSYS 1442 Lake Front Circle, The Woodlands, TX 77380-3600

^q Fermentas LIFE SCIENCES Pure Extreme

^f PCR Sprint Thermal Cycler Thermo Electron Corporation Milford MA 01757

gel de agarosa al 2%, corridos por electroforesis horizontal^{s,t} teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz ultravioleta^u.

Para la amplificación del espaciador interno transcrito 1 (ITS1) del DNA ribosomal, se utilizaron los iniciadores PN1 sentido (5'- CTCCTTCGGAGAGGGGTA-3') y PN2 contrasentido (5'- TCTTCCCTCAAA CGCTAT C -3')^v, complementarias a las regiones conservadas de 18S y 5.8S rRNA respectivamente, que amplifican un fragmento de 279 pares de bases. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: en una mezcla maestra de 50 µl, se agregaron, 5 µl de DNA, 19 µl de agua estéril, 5 µl de Buffer Taq (NH₄)₂SO₄ (10X), 1 µl dNTP's mix (10mM), 5 µl de cada iniciador (10 µM), 4 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl Taq DNA polimerasa (5U/µl) y 5 µl de solución de Enhancer. El PCR inicia con un ciclo de desnaturalización de 94°C por 5 minutos y 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Se tomaron 15 µl del producto amplificado y fueron cargados en un gel de agarosa al 2%, corridos por electroforesis horizontal, teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz ultravioleta.

9.- Limite de detección de DNA de taquizoitos de *N. caninum*

Para analizar el límite de detección de DNA de taquizoitos de *Neospora caninum* en los PCRs desarrollados, se realizaron diluciones decuples seriadas de una cantidad conocida de DNA (1, mismas que fueron utilizadas con los iniciadores para pNc5 y ITS1 y el resultado fue interpretado de acuerdo a la última dilución, en donde fue posible observar la presencia de una banda de aproximadamente 275 a 279 pb, estas pruebas fueron realizadas por duplicado.

8.- Análisis de resultados

^{s,t} Horizon 58 y Model 250 LIFE TECHNOLOGIES GIBCO BRL horizontal Gel Electrophoresis Apparatus and Electrophoresis Power Supply

^u UV Transilluminatur UVP Upland, CA

^v SIGMA GENOSYS 1442 Lake Front Circle, The Woodlands, TX 77380-3600

Para buscar la asociación entre el número de fetos positivos por histopatología e inmunohistoquímica, se realizó la comparación por χ^2 usando tablas de contingencia de 2X2. Para analizar si existe diferencia estadística entre el número de fetos con histopatología positiva, que fueron detectados como inmunopositivos por inmunohistoquímica y que amplificaron el DNA de *Neospora caninum* por PCR utilizando ITS1 y pNc5, se utilizó la prueba estadística de homogeneidad, que utiliza como estadístico de prueba a L que se distribuye como χ^2 , en donde la hipótesis nula es que ambas pruebas son homogéneas y la alternativa es que son diferentes.

La sensibilidad del PCR de Nc5 e ITS1, se determinó utilizando la fórmula: fetos positivos PCR/fetos verdaderamente positivos X 100. La especificidad se determinó utilizando la fórmula: fetos negativos PCR/fetos verdaderamente negativos X 100. Para determinar la concordancia entre el PCR y la histopatología e inmunohistoquímica, se utilizó la fórmula: fetos positivos PCR + fetos negativos PCR/fetos verdaderamente positivos + fetos verdaderamente negativos X 100.

$$\text{Sensibilidad PCR} = \frac{\text{Fetos positivos por PCR}}{\text{Fetos verdaderamente positivos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad PCR} = \frac{\text{Fetos negativos}}{\text{Fetos verdaderamente negativos}} \times 100$$

$$\text{Concordancia} = \frac{\text{Fetos positivos por PCR} + \text{Fetos negativos por PCR}}{\text{Fetos verdaderamente positivos} + \text{Verdaderamente negativos}} \times 100$$

Resultados

1.- Histopatología

De los 48 encéfalos de fetos evaluados por histopatología, en 29 casos (60.4%), se observaron lesiones características de neosporosis (histopatología positiva) y en 19 casos (39.58%) no se encontraron lesiones asociadas a este parásito (Figura 5). Las lesiones más frecuentemente observadas fueron microgliosis y

necrosis multifocal en 24 casos (82.75%). Solo se lograron observar quistes parasitarios por Hematoxilina y Eosina en un caso (Figura 6).

2.- Inmunohistoquímica

Se trabajaron un total de 144 tejidos. Se lograron demostrar antígenos de *Neospora caninum* en 21 casos (72.41%) al demostrar quistes o taquizoitos intra o extralesionales de color café rojizo. En 8 casos (27.58%) con histopatología positiva no se detectaron antígenos por IHQ (Figura 7).

Con base en el resultado del estudio histopatológico e inmunohistoquímico, el número de fetos por grupo fue de: 21 casos con histopatología e inmunohistoquímica positiva, 19 casos con histopatología e inmunohistoquímica negativa y 8 casos con histopatología positiva e inmunohistoquímica negativa (Cuadro 1).

La relación entre el número de fetos positivos por histopatología e inmunohistoquímica mostró una asociación estadísticamente significativa ($p < 0.005$). La probabilidad de que un feto con histopatología positiva sea positivo por inmunohistoquímica fue del 72.41%, mientras que la probabilidad de que un feto con histopatología negativa sea negativo por inmunohistoquímica fue de 0% para este estudio. La concordancia entre ambas pruebas fue de 0.83 (Cuadro 2).

3.- Extracción del DNA

Los dos métodos de extracción (reactivos comerciales de QIAGEN y el método no comercial) de DNA de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina, fueron exitosos en la amplificación del gen de prolactina. Para realizar todas las extracciones de los tejidos, se optó por el método de extracción casero debido a que por este método se logró obtener la mayor concentración de DNA que oscilaba entre 250-700 ng/ μ l y la relación de proteínas y DNA (260/280), se encontró mayor a 1, comparado con el método de extracción de QIAGEN en el

cual la cantidad de DNA fue menor y la relación proteínas DNA fue menor a 1. La cuantificación de DNA se realizó a través de luz ultravioleta utilizando un espectrofotómetro (DU^R 640B Marca Beckman).

Por otro lado se consiguió desarrollar el PCR para prolactina, con las siguientes condiciones: la mezcla madre de 50 µl, contenía 5 µl de DNA, 14 µl de agua estéril, 5 µl de Buffer Taq sin Mg (10X), 1 µl de dNTP's (10 mM), 2.5 µl de cada iniciador (10µM), 4 µl de MgCL (25mM), 2.5 U Taq DNA polimerasa (5U/µl)*. Se inicio con un ciclo de desnaturalización de 95°C por 5 minutos y después 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2% (Figura 8).

4.- PCR de las muestras

4.1 Limite de detección de DNA

La cantidad mínima requerida de DNA de taquizoitos de *N. caninum* con la que el PCR fue exitoso utilizando el gen ITS1 con los iniciadores PN1 y PN2 y las condiciones antes descritas fue de 100 fg de DNA (equivalente a 1 taquizoito) (Figura 9).

El límite de detección de DNA de taquizoitos de *N. caninum* requerido para realizar una amplificación exitosa del gen pNc5 con los iniciadores Np7 sentido y Np4 se encontró entre 10 y 1 pg de DNA (equivalente a 10-100 taquizoitos) (Figura 10).

4.2 PCR de las muestras

El resultado de los fetos analizados por histopatología, inmunohistoquímica y PCR utilizando las regiones pNc5 e ITS1 se muestran en el Cuadro 3. Se encontraron 15 casos positivos con los iniciadores PN1 y PN2 para la región ITS1 (Figura 11). Con los iniciadores Np7 y Np4 de la región pNc5, se detectó DNA de *N. caninum*

en 12 encéfalos (Figura 12). La sensibilidad para ITS1 y pNc5 fue del 71.42% y del 57.14% respectivamente. Por otro lado no se logró detectar PCRs positivos en ITS1 y pNc5 en ninguno de los casos del grupo 2, por tanto la especificidad para ambos casos fue del 100%. La concordancia entre la histopatología e inmunohistoquímica con el PCR de ITS1 fue del 85% y para el caso de pNc5 fue de 77.5%.

Al comparar el número de fetos positivos por IHQ y PCR basado en ITS1, no se encontró diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) (Cuadro 4), y cuando se comparó con el número de fetos positivos por amplificación de un fragmento de pNc5, si se encontró diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) (Cuadro 5).

La capacidad para detectar DNA de *Neospora caninum* en fetos fijados en formalina e incluidos en parafina utilizando PCR de ITS1 y pNc5 no fue estadísticamente diferente (Cuadro 6).

Discusión y Conclusiones

El alto porcentaje de fetos con lesiones histopatológicas consistentes con neosporosis (60.4%) caracterizadas principalmente por necrosis y microgliosis multifocal (82.75%) y que de estos, el 72.41% fueron positivos por inmunohistoquímica, es similar a los resultados observados por Morales⁴⁵ *et al.*, en donde se analizaron 211 fetos colectados en diversas establos lecheros de la republica mexicana, encontrándose que 73 casos (34.59%) exhibían lesiones consistentes con neosporosis y de estos, el 53% (39 casos), mostraban microgliosis y necrosis multifocal en SNC. De los 73 casos con histopatología positiva, solo se analizaron por IHQ 53 casos, observándose inmunopositividad a antígenos de *Neospora caninum* en 41 casos (77%). De igual forma Pereira-Bueno⁶⁷ *et al.*, realizaron un estudio con 80 fetos encontrando que el 38.8% de estos fueron positivos a neosporosis por al menos alguna técnica diagnóstica (histopatología, inmunohistoquímica, serología y PCR). El porcentaje de fetos con lesiones sugerentes a *Neospora caninum* en SNC fue del 31.3% (25 casos), así mismo solo se realizó IHQ en 13 fetos encontrando inmunopositividad en 7 casos (53.84%) siendo similar a los porcentajes de inmunopositividad en tejidos fetales afectados por *N. caninum*, observados por González *et al.*, (50%)⁶⁸ y Otter *et al.*, (40%)⁶⁹ en España y Reino Unido. En otro estudio, Kim⁷⁰ *et al.*, estudiando 180 fetos encontraron 45 casos (25%) con lesiones compatibles con neosporosis y de estos, 16 casos (35.55%) fueron inmunopositivos por IHQ a antígenos de *N. caninum* en SNC. Estos estudios demuestran que el examen histopatológico de los fetos afectados por *N. caninum* es de suma importancia para tener un diagnóstico presuntivo de esta entidad, y que existe una fuerte asociación entre la histopatología y la demostración de quistes o taquizoitos de *N. caninum* a través de la inmunohistoquímica como se observó en el presente estudio en donde la asociación fue estadísticamente significativa, con una concordancia del 0.83 y el riesgo de que un feto con histopatología positiva sea positivo por inmunohistoquímica fue del 72.41%. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica varía de acuerdo con el

laboratorio que la realiza, como lo muestra un estudio de interlaboratorios en Europa⁷¹ en donde participaron 7 laboratorios. En este estudio se compararon el método de PCR y de inmunohistoquímica para la detección de *N. caninum* en tejidos fetales de bovino. Para el caso de la inmunohistoquímica se trabajaron 36 casos, de los cuales 21 fueron positivos a neosporosis (16 confirmados por IHQ, 5 por PCR anidado) 2 fueron muestras de tejidos de placenta de un ovino infectado de forma experimental con *N. caninum*, 11 fueron muestras negativas (6 por IHQ y 5 por PCR) y dos fueron muestras de encéfalo de feto de ovino experimentalmente infectado con *Toxoplasma gondii*. La prueba de oro para comparar los resultados de inmunohistoquímica y determinar su sensibilidad, especificidad y concordancia de este estudio, se basó en resultados previos de las muestras con los siguientes criterios: 1) la presencia de lesiones histopatológicas sugerentes de neosporosis en combinación con inmunohistoquímica positiva, 2) PCR positivo (ITS1) y 3) tejidos infectados de forma experimental con *N. caninum*. Los laboratorios que utilizaron un anticuerpo primario policlonal conejo anti-*N. caninum* y el método de amplificación complejo-streptoavidina-biotina-peroxidasa, demostraron una sensibilidad del 61 al 78%, especificidad del 85 al 100% y concordancia de 0.69 al 0.72. Estos resultados concuerdan con lo observado en el presente estudio ya que si se toma en cuenta a la histopatología positiva como indicadora de neosporosis se puede inferir que la sensibilidad en este estudio fue del 72.41% con especificidad del 100%. En un estudio de van Manen,⁷¹ también se realizó una inmunohistoquímica semicuantitativa, en donde se clasificaron los tejidos positivos por IHQ en cuatro grados de acuerdo a la cantidad de parásitos detectados de la siguiente manera: 0=sin parásitos, 1=1-5 parásitos, 2=6-10 parásitos, 3= mas de 10 parásitos y se compararon con el número de laboratorios que dieron positivo cada caso, encontrando 0% para la categoría 0, 40% para la 1, 52.3% para la 2 y 83.3% para la 3, lo que indica una correlación positiva entre el número de parásitos en los tejidos y el éxito en la identificación de taquizoitos de *N. caninum*. En el presente estudio se puede inferir que tal vez los casos con histopatología positiva e inmunohistoquímica negativa, pudieron tener un bajo

número de parásitos, por lo cual no fueron detectados o que se debió incluir una mayor cantidad de cortes seriadas de cada encéfalo.

La sensibilidad y especificidad encontradas en este estudio con ITS (71.42% y 100%) y pNc5 (57.14% y 100%) concuerda con lo observado en Europa⁷¹ en una comparación interlaboratorios que se realizó para la detección de *N. caninum* en tejidos fetales de bovino a través de PCR utilizando la región del ITS1 y el gen pNc5. En este estudio siete laboratorios trabajaron con las mismas 76 muestras: 30 fetos positivos (25 confirmados por histopatología e inmunohistoquímica y 5 confirmados por PCR), 14 fetos negativos (9 con histopatología negativa y 5 negativos por PCR) y 32 muestras que correspondían a tejido cerebral homogeneizado inoculado con taquizoitos de *N. caninum*. La prueba de oro para comparar los resultados de PCR obtenidos en las muestras y determinar su sensibilidad, especificidad y concordancia, se basó en resultados previos de las muestras con los siguientes criterios: 1) la presencia de lesiones histopatológicas sugerentes de neosporosis en combinación con inmunohistoquímica positiva, 2) PCR positivo (ITS1) y homogeneizados de encéfalo con taquizoitos de *N. caninum*. En cuatro laboratorios, el PCR estaba basado en la amplificación de un fragmento del gen pNc5, encontrando una sensibilidad en los laboratorios del 57 al 83%, especificidad del 94 al 100% y la concordancia de 0.39 al 0.65. En tres laboratorios se utilizó el ITS1, encontrando una sensibilidad del 67 al 73%, especificidad del 83 al 100% y concordancia de 0.33. Un laboratorio utilizó el gen del rRNA-SSU y 5.8S, encontrando una sensibilidad del 78%, especificidad del 100% y concordancia de 0.81. La sensibilidad y concordancia del PCR desarrollado en el presente estudio con ITS1 fue superior a lo observado en España,⁶⁷ en donde se compararon los resultados de 16 fetos con histopatología y serología positiva a neosporosis, contra un PCR anidado utilizando el ITS1 con los iniciadores NN1, NN2, NP1, NP2, encontrando 4 fetos positivos por PCR, por lo que se demostró una baja sensibilidad (25%), pobre concordancia con la histopatología ($k=0.23$) y alta especificidad (94%). Ellis⁴⁷ *et al.*, realizaron dos estudios retrospectivos utilizando un PCR basado en iniciadores derivados de

ITS1, para detectar DNA de *Neospora caninum* en encéfalos y corazones fijados en formalina e incluidos en parafina que mostraban lesiones compatibles con neosporosis, tales como encefalitis no supurativa y miocarditis. De los 40 fetos que mostraban estas lesiones solo, 16 casos (40%) fueron positivos por PCR. Ellis⁷² et al., proponen el desarrollo de un PCR anidado en un solo tubo para aumentar la sensibilidad en la detección de DNA de *Neospora caninum*. Para lo cual utilizó un PCR anidado con los iniciadores externos NF1 y NS2 y los internos NR1 y SR1, demostrando que el límite de detección de DNA genómico de *Neospora caninum* fue de 10 y 1 fg, lo que equivale a 0.1-0.01 taquizoitos. Sin embargo, cuando se utilizó el PCR para detectar DNA de *Neospora caninum* en 30 fetos de bovino, que en el examen histopatológico mostraron lesiones compatibles con neosporosis (encefalitis necrótica y miocarditis no supurativa), se encontró que solo 8 casos fueron positivos (26.66%), lo que puede indicar una baja sensibilidad de este PCR cuando se aplica a muestras clínicas fijados en formalina e incluidos en parafina.

Para el PCR de pNc5 los resultados difieren con lo observado por Paula⁷³ et al., quienes evaluaron un juego de iniciadores para realizar un PCR anidado con el gen pNc5 para la detección *N. caninum* en encéfalos de fetos de bovino infectados naturalmente. El PCR I estaba constituido por los iniciadores Np21-Np6 y Np7-Np4, para el PCR II Np21-Np6 y Np7-Np6 y para el PCR III se utilizaron Np7-Np4 y Np7-Np6. Las tres combinaciones de PCR fueron capaces de amplificar DNA de *Neospora caninum* diluidos a 10^1 parásitos por mL en homogeneizados de encéfalo de bovinos. Sin embargo, con las condiciones del experimento, el PCR I y II amplificaba múltiples bandas inespecíficas, mientras que el PCR III solo mostró la banda de 227 pb. Con base en estos resultados, se decidió aplicar el PCR III a 32 muestras de encéfalos de fetos abortados para de detección específica de *N. caninum*. La distribución focal de los taquizoitos o quistes del parásito a través de los tejidos afectados, es una importante característica que debe tomarse en cuenta al momento de aplicar un técnica directa para detectar al parásito. Por tanto cada encéfalo fue analizado 6 veces para minimizar el riesgo de resultados falsos negativos. De las 32 muestras analizadas por el PCR III, 10

fueron positivas, sin embargo, en la amplificación primaria utilizando los iniciadores Np7 y Np4 en 4 casos no se logró un PCR positivo en ninguna de las seis veces que se analizó la muestra. En un estudio realizado en Corea⁷⁰ se analizaron por PCR anidado 45 fetos de bovinos, que mostraban lesiones compatibles con *Neospora caninum*. Para el PCR anidado se utilizó la combinación Np7-Np4 y Np7-Np6 para el gen pNc5. Se encontraron 34 fetos positivos por PCR (75.55%), los 11 casos restantes que fueron negativos, mostraban lesiones histológicas de moderadas a graves en encéfalo. Bazler⁷⁴ et al., realizaron un estudio en Estados Unidos, en donde investigó la utilidad del PCR para la identificación de infección por *Neospora caninum* en fetos abortados de bovino fijados en formalina e incluidos en parafina y en tejido fresco, a través del uso de PCR con los iniciadores Np7-Np4 que amplifican una porción del gen pNc5. Para determinar la sensibilidad y especificidad del PCR se formaron tres grupos de trabajo: 1) fetos con histopatología e inmunohistoquímica positiva, 2) fetos con histopatología e inmunohistoquímica negativa y 3) fetos con histopatología positiva e inmunohistoquímica negativa y se calculó su concordancia. El límite de detección para el PCR fue de 20 a 40 taquizoitos en 20 mg de tejido (encéfalo). La sensibilidad y especificidad en tejidos frescos fue del 77% y 100% respectivamente y para los tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina fue del 100% y 97%. La concordancia fue del 97% para tejidos fijados y del 88% para tejidos frescos. El PCR también detectó DNA de *Neospora caninum* en 6 de 8 fetos que tenían histopatología positiva pero fueron negativos por inmunohistoquímica, indicando una alta sensibilidad del PCR comparada con la inmunohistoquímica. La mayor sensibilidad de este PCR difiere con lo observado en el presente estudio utilizando pNc5, esto se puede deber a que en seis fetos se observaron cambios histopatológicos positivos de grado moderado. Al respecto se menciona que el PCR puede no ser capaz de detectar DNA de *N. caninum*, en fetos con este grado de lesión⁷⁰ y que el número de parásitos en los tejidos fue bajo.

Cuando se indica al PCR como un método diagnóstico, se estima que este posee una alta sensibilidad para detectar DNA del microorganismo de nuestro interés. Sin embargo, de acuerdo a los resultados de este estudio y a los resultados encontrados en otros estudios mencionados anteriormente, indican que el PCR no cubre estas expectativas en el caso de la neosporosis, debido que la sensibilidad es altamente variable y que por lo general no llega al 100%, estando en función del laboratorio que lo está realizando. Las principales causas por las cuales el PCR muestra una sensibilidad relativamente baja son: 1) Distribución focal y al azar de los parásitos. Al respecto De Marez⁷⁵ *et al.*, encontraron que la detección de *N. caninum* en ganado experimentalmente infectado con ooquistes de este parásito, utilizando diferentes porciones del mismo tejido no siempre son positivos, indicando que los parásitos no se distribuyen de forma uniforme en los tejidos afectados. 2) Bajo número de parásitos presentes en los tejidos. Paula⁷³ *et al.*, De Marez⁷⁵ *et al.*, y Ho⁷⁶ *et al.*, observaron que en reacciones repetidas de PCR del mismo tejido, no siempre se detecta el DNA del parásito, lo que indica una cantidad pequeña de parásitos en los tejidos afectados. 3) Características del tejido utilizado para el PCR. Bazler⁷⁴ *et al.*, encontraron diferencias entre la sensibilidad obtenida de tejidos en fresco (77%) y los fijados en formalina e incluidas en parafina (100%), esto debido a que generalmente los tejidos que fueron fijados en formalina e incluidos en parafina previamente son analizados por histopatología, lo que lleva a una mejor selección de los tejidos que serán analizados por PCR. 4) El órgano utilizado para el PCR, generalmente es el encéfalo debido a que en este se encuentran con mayor frecuencia lesiones y parásitos. 5) Grado de lesión histopatológica. Bazler⁷⁴ *et al.*, y Kim⁷⁰ *et al.*, mencionan que cuando el grado de lesión histopatológica es moderado, el PCR puede no ser capaz de detectar DNA de *Neospora caninum*. 6) Calidad de los tejidos. Generalmente los fetos se encuentran autolizados por lo cual el DNA del parásito puede estar degradado. 7) Diferencia en la metodología de la extracción del DNA. La extracción de DNA genómico de buena calidad de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (TFFIP) es difícil debido a que solo una pequeña proporción de DNA intacto puede estar presente en los tejidos. Por lo cual el éxito

en la amplificación de un fragmento de DNA de TFFIP es críticamente dependiente de varios factores que incluyen, manipulación del tejido antes de su fijación, tipo de fijador utilizado, tiempo de fijación, temperatura y tiempo de almacén de los tejidos y condiciones del PCR.^{77,78} La exposición de los tejidos a formalina provoca la formación de puentes cruzados entre histonas e histonas y el DNA, y falta de digestión de proteínas por parte de la proteinasa K. Los cambios antes mencionados provocan pobre calidad y cantidad de DNA, lo que se refleja en un PCR poco exitoso. Sin embargo, la extracción de DNA de TFFIP con calor, ha demostrado que el calentamiento de los TFFIP a altas temperaturas y pH alcalino mejora la calidad y cantidad del DNA comparado con el método tradicional de digestión enzimático.^{79,80}

El número de casos detectados como positivos por IHQ y PCR ITS1 aunque es diferente, esta diferencia no fue estadísticamente significativa utilizando el estadístico de prueba, sin embargo, cuando se comparó con PCR pNc5 se encontró una diferencia estadística significativa, lo que significa que la IHQ fue mas eficiente en detectar animales positivos que el PCR (pNc5). Estos resultados difieren con las observaciones realizadas por Bazler⁷⁴ *et al.*, en donde encontraron que el PCR (pNc5), fue capaz de detectar más fetos con neosporosis que la inmunohistoquímica. Esta diferencia se podría explicar debido a que en el presente estudio se realizaron 3 cortes seriados de cada caso lo que pudo incrementar la capacidad de la prueba para detectar quistes o taquizoitos de *N. caninum* ya que la sensibilidad de esta prueba es dependiente del número de parásitos y de cortes histológicos examinados.

El no encontrar diferencias estadísticas significativas entre el número de fetos positivos detectados por ITS1 y pNc5 podría ser debido a que las lesiones histopatológicas en 6 fetos fueron moderadas, la cantidad de parásitos fue baja, posible degradación del DNA parasitario por autólisis, fijación de los tejidos con formalina y por la distribución al azar del parásito en encéfalo.

Los resultados que se encontraron en este estudio no muestran una diferencia en la utilización del PCR (ITS1 e pNc5) en cuanto al número de fetos positivos a *N. caninum* que fueron fijados en formalina e incluidos en parafina, con respecto a la inmunohistoquímica. Sin embargo, de acuerdo a algunas características de la neosporosis como lo son la distribución al azar y bajo número de parásitos en los tejidos detectados por histopatología, se propone el empleo de la inmunohistoquímica teniendo en cuenta las variables como son: personal con experiencia en la realización de la técnica, análisis de diferentes partes de tejido afectado, con cortes seriados, así como un método de amplificación adecuado (CABP), para incrementar la sensibilidad de la inmunohistoquímica, cubriendo el hueco que deja el PCR, en ausencia de técnicas moleculares que ayuden a incrementar con certeza la sensibilidad del PCR para detectar animales con neosporosis.

Referencias

- 1.- Dubey JP, Lindsay DS. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1996;67:1-59.
- 2.- Dubey JP. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol* 1999;84:349-367.
- 3.- Barr BC, Bjerkas I, Buxton D, Conrad PA, Dubey JP. Neosporosis; Report of the International *Neospora* Workshop. *Parasitol* 1997;19: 120-144.
- 4.- Lindsay DS, Dubey JP. Canine neosporosis. *J Vet Parasitol* 2000;14:1-11.
- 5.- Dubey JP, Koestner A, Piper RC. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1990;197:857-860.
- 6.- Bjerkas I, Mohn SF, Presthus J. Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z Parasitenkd* 1984; 70:113-117.
- 7.- Bjerkas I, Dubey JP. Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma* -like parasite of Norwegian dogs. *Acta Vet Scand* 1991;32:1407-1417.
- 8.- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1988;192:1269-1285.
- 9.- Dubey JP, Hattel AL, Lindsay DS, Topper MJ. Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs: Isolation of the causative agent and experimental transmission. *J Am Vet Med Assoc* 1988;193:1259-1263.
- 10.- Dubey JP, Lindsay DS. Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs. *Am J Vet Res* 1989;50:1578-1579.

11.- Dubey JP, Lindsay DS. Neosporosis in dogs. *Vet Parasitol* 1996;36:147-151.

12.- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, MacGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *J Parasitol* 1998;28:1473-1478.

13.-Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlinka. Coyotes (*canis latrans*) are definitive host of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol*;34:159-161.

14.- Speer CA, Dubey JP. Ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cyst of *Neospora caninum*. *J Protozool* 1989;36:458-463.

15.- Lindsay DS, Speer CA, Toivio-Kinnucan MA, Dubey JP, Blagburn BL. Comparative ultrastructure of *Neospora caninum* from dogs and *Toxoplasma gondii* in cultured cells. *Am J Vet Res* 1993;54:103-106.

16.- Jardine JE. The ultrastructure of bradyzoites and tissue cyst of *Neospora caninum* in dogs: Absence of distinguishing morphological features between parasites of canine and bovine origin. *Vet Parasitol* 1996;62:231-240.

17.- Speer CA, Dubey JP, McAllister MM, Blixt JA. Comparative ultrastructure of tachyzoites, bradyzoites and tissue cyst of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Int J Parasitol* 1999;29:1509-1519.

18.- Lindsay DS, Dubey JP. Infections in mice with tachyzoites and bradyzoites of *Neospora caninum* (Protozoa:Apicomplexa). *J Parasitol* 1990;76:410-413.

19.- Dubey JP. *Vet Med Today: Clinical Update: Neosporosis in cattle: biology and economic impact.* *J Am Anim Hosp Assoc* 1999;214:1160-1163.

20.- Wouda W. Diagnosis and epidemiology of bovine neosporosis: A review. *Vet Quart* 2000;22:71-74.

- 21.- Dubey JP, Koestner A, Piper RC. Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs. J Am Vet Med Assoc 1990;197:857-860.
- 22.- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol 1999;82:327-333.
- 23.- Bartels CJ, Wouda W, Schukken YH. Risk factors for *Neospora caninum* associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands. Theriogenology 1999;52:247-257.
- 24.- Thurmond MC, Hietala SK. Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. Am J Vet Res 1997;58:1381-1385.
- 25.- Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EAM, van Werven T. Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. Theriogenology 1998;49:1301-1309.
- 26.- Morales SE, Trigo FJ, Ibarra FV, Puente EC, Santacruz M. Seroprevalence study of bovine neosporosis in México. J Vet Diagn Invest 2001;13:413-415.
- 27.- Innes EA, Panton WA, Trees AJ, Holmdahl OJM, Buxton D. Interferon gamma inhibits the intracellular multiplication of *Neospora caninum* as shown by incorporation of 3H Uracil. J Comp Pathol 1995;113:95-100.
- 28.- Yamane I, Kitani H, Kokuho T, Shibahara T, Haritari M, Hamaoka T, Shimuzo S, Koiwai M, Shimura K, Yokomizo Y. The inhibitory effect of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha on intracellular multiplication of *Neospora caninum* in primary bovine brain cells. J Vet Med Sci 2000;62:347-351.
- 29.- Lunden A, Marks J, Maley S, Innes EA. Cellular immune responses in cattle experimentally infected with *Neospora caninum*. Parasite Immunol 1998;20:519-526.

- 30.- Marks J, Lunden A, Harkins D, Inees EA. Identification of *Neospora caninum* antigens recognized by CD4+ T-cells and immune sera from experimentally infected cattle. *Parasite Immunol* 1998;20:303-309.
- 31.- Khan I, Schwartzman J, Fonseka S, Kasper L. *Neospora caninum*: role for immune cytokines in host immunity. *Exp Immunol* 1997;85:24-34.
- 32.- Tangri S, Ragupathy R. Expression of cytokines in placentae of mice undergoing immunologically mediated spontaneous fetal resorptions. *Biol Reprod* 1993;49:850-856.
- 33.- Innes EA, Andrianarivo AG, Bjorkman C, Williams DJL, Conrad PA. Immune responses to *Neospora caninum* and prospects for vaccination. *Trends Parasitol* 2002;18:497-504.
- 34.- Innes EA, Wright SE, Maley S, Rae A, Schock A, Kirvar E, Bartley P, Hamilton C, Carey IM, Buxton D. Protection against vertical transmission in bovine neosporosis. *Int J Parasitol* 2001;31:1523-1534.
- 35.- Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. IL-12 deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naïve T helper cells. *J Immunol* 1997;159:28-35.
- 36.- Williams DJL, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, MacEachern K, Cripps P, Kelly DF, Trees AJ. *Neospora caninum* associated abortion in cattle: the time of experimentally-induced parasitaemia during gestation determines foetal survival. *Parasitol* 2000;121:347-358.

- 37.- Macaldowie C, Maley SW, Wright S, Bartley P, Esteban-Redondo I, Buxton D, Innes EA. Placental pathology associated with fetal death in cattle inoculated with *Neospora caninum* by two different routes in early pregnancy. J Comp Pathol 2004;131:142-156.
- 38.- von Blumröder D, Schares G, Norton R, Williams D.J.L, Esteban-Redondo, Wright S, Bjorkman C, Frosslinh J, Risco-Castillo V, Fernandez-García A, Ortega-Mora LM, Sager H, Hemphill A, van Maanen C, Wouda W, Conraths FJ. Comparison and standardization of serological methods for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in bovines. Vet Parasitol 2004;120:11-22
- 39.- Paré J, Hietala SK, Thurmond MC. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serological diagnosis of *Neospora* sp: Infection in cattle. J Vet Diagn Invest 1995;7:352-359.
- 40.- Frosling J. Bonnett B, Lindberg A, Bjorkman C. Validation of a *Neospora caninum* iscom ELISA without a gold standard. Prev Vet Med 2003;57:141-153.
- 41.- Björkman C, Naslud K, Stenlund S, Malcy SW, Buxton D, Ugglä A. An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infections. J Vet Diagn Invest 1999;11:41-44.
- 42.- Barr BC, Anderson ML, Sverlow KW, Conrad PA. Diagnosis of bovine fetal *Neospora* infection with an indirect fluorescent antibody test. Vet Rec 1995;137:611-613.
- 43.- Romand S, Thulliez P, Dubey JP. Direct Agglutination test for serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Parasitol Res 1998;60:50-53.
- 44.- Lindsay DS, Dubey JP. Immunohistochemical diagnosis of *Neospora caninum* in tissue sections. Am J Vet Res 1989;50:1981-1983.

- 45.- Morales SE, Trigo JP, Ibarra FV, Puente EC, Santacruz M. Neosporosis in mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. J. Comp Path 2001;125:58-63.
- 46.- Gottstein B, Hentrich B, Wyss R, Thür B, Busato A, Stärk KDC, Müller N. Molecular and immunodiagnostic investigations on bovine neosporosis in Switzerland. Int J Parasitol 1998;28:679-691.
- 47.- Ellis JT. Polymerasa chain reaction approaches for the detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol 1998;28:1053-1060.
- 48.- Holmdahl OJM, Mattsson JG. Rapid and sensitive identification of *Neospora caninum* by *in vitro* amplification of the internal transcribed spacer 1. Parasitol 1996;112:177-182.
- 49.- Gondim LFP, Laski P, Gao L, McAllister MM. Variation of the internal transcribed spacer 1 within individual strain and among different strain of *Neospora caninum*. J Parasitol 2004;90:119-122.
- 50.- Yamage M, Flechtner O, Gottstein B. *Neospora caninum*: Specific oligonucleotide primers for the detection of brain "cist" DNA of experimentally infected nude mice by the polymerase chain reaction (PCR). J Parasitol 1996;82:272-279.
- 51.- Ferroglio E, Wambwa E, Castiello M, Trisciuglio A, Prouteau A, Pradere E, Ndungu S, De Meneghi D. Antibodies to *Neospora caninum* in wild animals from Kenya, East Africa. Vet Parasitol 2003;118:43-49.
- 52.- Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol 2003;41:1-16.

- 53.- Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol* 2004;34:159-161.
- 54.- Vianna MCB, Sreekumar C, Miska KB, Hill DE, Dubey JP. Isolation of *Neospora caninum* from naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Veterinary Parasitology* 2005;129:253-257.
- 55.- Gondim LFP, McAllister MM, Mateus-Pinilla NE, Pitt WC, Mech LD, Nelson ME. Transmission of *Neospora caninum* between wild and domestic animals. *J Parasitol* 2004;90:1361-1365.
- 56.- Anderson ML, Blanchart PC, Barr BC, Dubey JP, Hoffman RL, Conrad PA. *Neospora*-like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:241-244.
- 57.- Davison HC, Otter A, and Trees. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally calving cattle. *Int J parasitol* 1999;29: 1189-1194.
- 58.- Meerschman FC, Focant R, Boreux R, Leclipteux T, Losson B. Cattle neosporosis in Belgium: A case-control study in dairy and beef cattle. *Int J Parasitol* 2000;30:887-899.
- 59.- Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, Picanso JP, Blandchard PC, Breitmeyer RE, Layton AW, Daft B, McAllister C, Kinde H. Evaluation of abortion in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. *J Am Vet Med Assoc* 1995;207:1206-1210.
- 60.- Reichel MP. *Neospora caninum* infections in Australia and New Zealand. *Australian Vet J* 2000;78:258-261.

- 61.- Abbitt B, Craig TM, Jones LP, Huey RL, Eugster AK. Protozoal abortion in a herd of cattle concurrently infected with *Hammondia pardalis*. J Am Vet Med Assoc 1993;20:444-448.
- 62.- Delgado GR, Quintero CJ, Luna AA. Estudio patológico, microbiológico y serológico del aborto en bovinos Holstein de la Comarca Lagunera. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría. Torreón Coahuila, México, 24-26 Agosto 1995, pp. 74-78.
- 63.- Morales SE, Ramírez LJ, Trigo TF, Ibarra VF, Puente CE, Santacruz M. Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora* sp. en México. Vet Mex 1997;28:353-357.
- 64.- García VZ, Cruz VC, Medina EL, García TD, Chavarria MB. Serological survey of *Neospora caninum* in dairy cattle herds in Aguascalientes, México. Vet Parasitol 2002;106:115-120.
- 65.- Sánchez GF, Morales SF, Martínez MJJ, Trigo TJF. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. Can J Vet Res 2003;67:142-147.
- 66.- Medina L, Cruz-Vazquez C, Quezada T, Morales SE, Garcia-Vázquez. Survey of *Neospora caninum* by nested PCR in aborted fetuses from dairy farms in Aguascalientes, México. Vet Patol 2006;136:187-191.
- 67.- Pereira-Bueno J, Quintanilla-Gozalo A, Pérez-Pérez V, Espi-Felgueroso A, Álvarez-García G, Collantes-Fernández E, Ortega-Mora LM. Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with *Neospora caninum* in Spain. Vet Parasitol 2003;111:143-152.

68.- González L, Buxton D, Atxaerandio R, Aduriz G, Maley S, Marco JC, Cuervo LA. Bovine abortion associated with *Neospora caninum* in northern Spain. *Vet Rec* 1999;144: 145-150.

69.- Otter A, Jeffrey M, Griffiths IB, Dubey JP. A survey of the incidence of *Neospora caninum* infection in aborted and stillborn bovine fetuses in England and Wales. *Vet Rec* 1995;136:602-606.

70.- Kim JH, Lee JK, Lee BC, Park BK, Yoo HS, Hwang WS, Shin NR, Kang MS, Jean YH, Yoon HJ, Kang SK, Kim DY. Diagnostic survey of bovine in Korea: with special emphasis on *Neospora caninum*. *J Vet Med Sci* 2002;64: 1123-1127.

71.- van Maanen C, Wouda W, Schares G, von Bluroder D, Conrats FJ, Norton R, Williams DJ, Esteban-Redondo I, Innes EA, Mattsson JG, Bjorkman C, Fernandez-Garcia A, Ortega-Mora LM, Muller N, Sager H, Hemphill A. An interlaboratory comparison of immunohistochemistry and PCR methods for detection of *Neospora caninum* in bovine foetal tissues. *Vet Parasitol* 2004;126:351-364.

72.- Ellis JT, McMillan D, Ryce C, Payne S, Atkinson R, Harper P AW. Development of single tube nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Neospora caninum* DNA. *Int J Parasitol* 1999;29:1589-1596.

73.- Paula VSO, Rodríguez AAR, Richtzenhain LJ, Cortez A, Soares RM, Gennari SM. Evaluation of a PCR based on primers to Nc5 gene for the detection of *Neospora caninum* in brain tissues of bovine aborted fetuses. *Vet Res Commun* 2004;28:581-585.

74.- Bazzler TV, Gay LJ, Long MT, Mathison BA. Detection by PCR of *Neospora caninum* in fetal tissues from spontaneous bovine abortions. *J Clin Microbiol* 1999;37:4059-4064.

75.- De Marez T, Liddell S, Dubey JP, Jenkins MC, Gasbarre L. Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. Int J Parasitol 1999;29:1647-1657.

76.- Ho MSY, Barr BC, Rowe JD, Anderson ML, Sverlow KW, Packham AE, Marsh AE, Conrad PA. Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. J Parasitol 1997;83:508-514.

77.- Goelz SE, Hamilton SR, Vogelstein B. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. Biochem Biophys Res Commun 1985;130:118-126.

78.- Greer CE, Peterson SL, Kiviat NB. PCR amplification from paraffin-embedded tissue. Effects of fixative and fixation time. Am J Clin Pathol 1991;95:117-124.

79.- Shi S, Cote RJ; Wu L, Liu C, Datar R, Shi Y, Liu D. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. J Histochemistry and Cytochemistry 2002;50:1005-1011.

80.- Shi S, Datar R, Liu C, Wu L, Zhang Z, Cote RJ, Taylor CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. Histochem Cell Biol 2004;122:211-218.

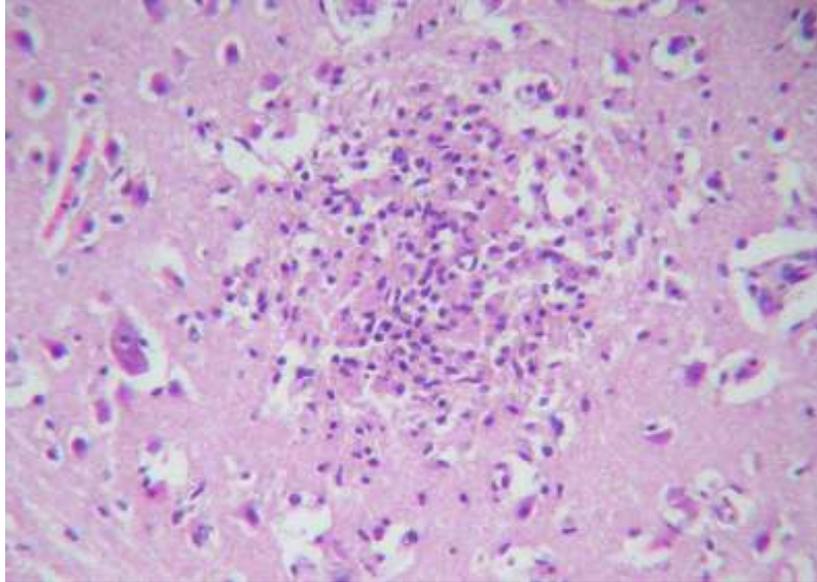


Figura 1

Encéfalo de feto de bovino mostrando una zona de necrosis con agregados de células gliales. Tinción Hematoxilina y Eosina 400X

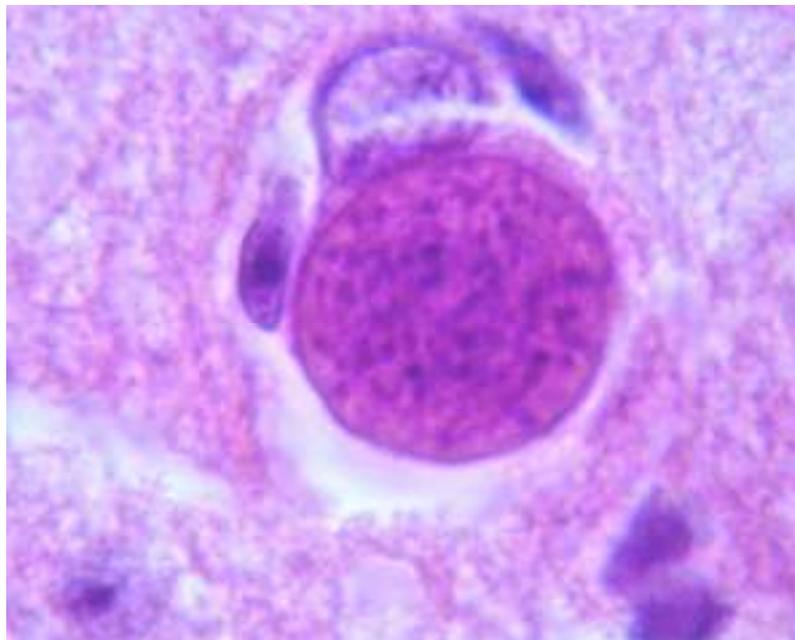


Figura 2

Encéfalo de feto de bovino que exhibe un quiste intraneuronal de *Neospora caninum* que conteniendo abundantes taquizoitos. Tinción Hematoxilina y Eosina 1000X

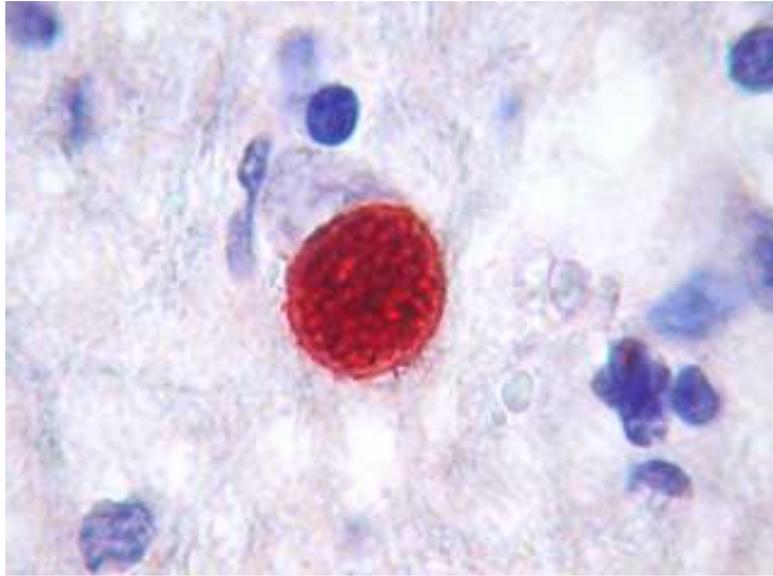


Figura 3

Encéfalo de feto de bovino que muestra inmunopositividad marcada en un quiste intraneural de *Neospora caninum*. Técnica IHQ (CAB-P 1000X)

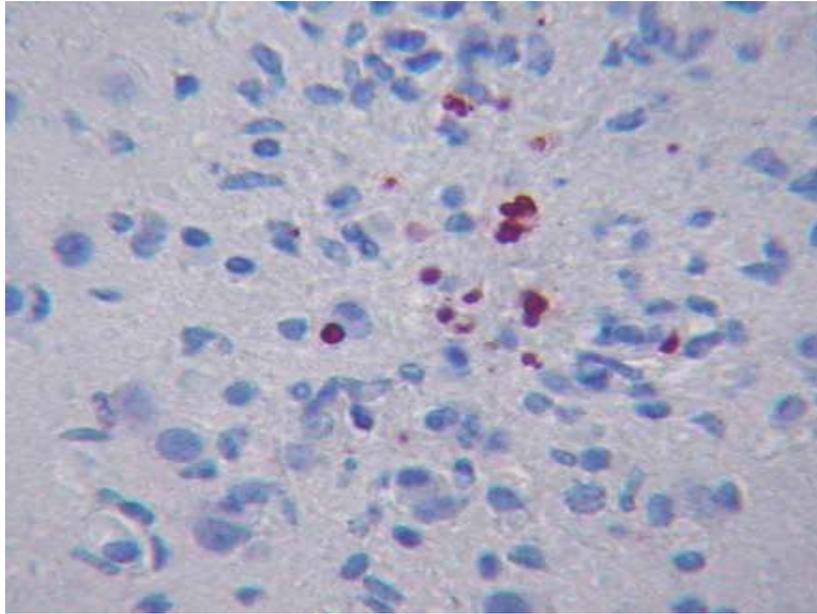
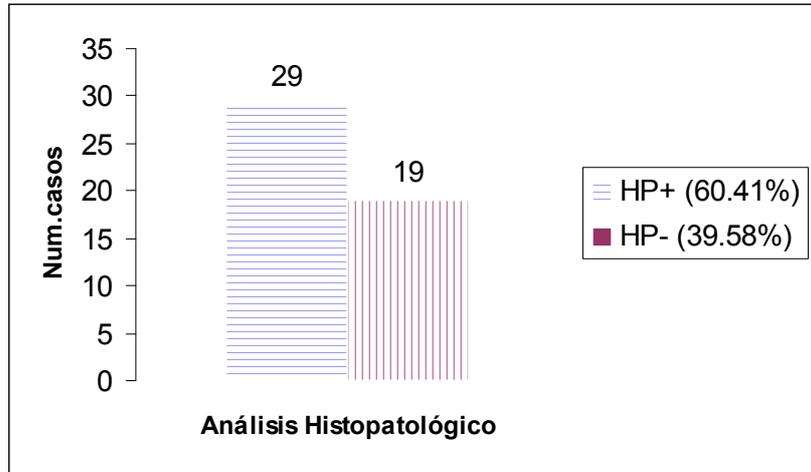


Figura 4

Encéfalo de feto de bovino que exhibe inmunopositividad en taquizoitos de *Neospora caninum* que se encuentran al centro de una zona de necrosis y gliosis. Técnica IHQ (CAB-P 1000X)

Figura 5

Frecuencia de los 48 fetos que mostraron histopatología positiva y negativa



HP+= Histopatología positiva
HP- = Histopatología negativa

Figura 6

Lesiones microscópicas en encéfalo mas frecuentemente observadas en los fetos.

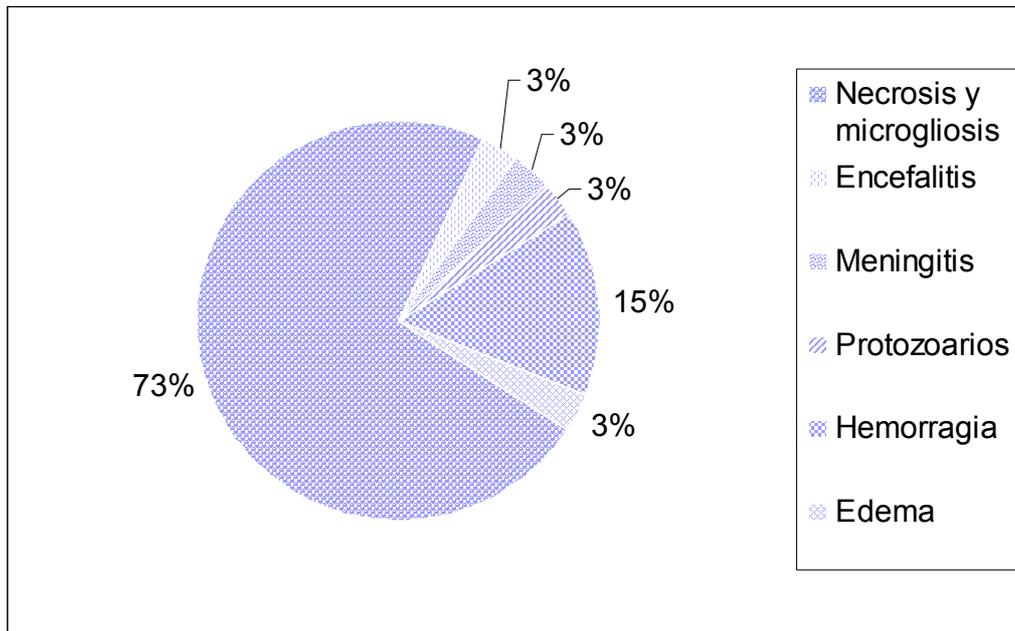
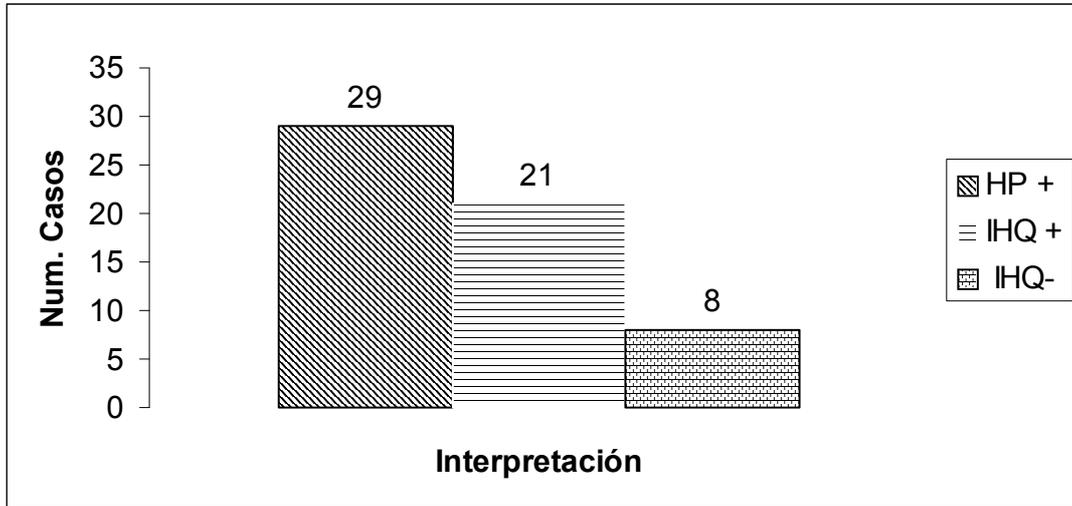


Figura 7

Número de fetos con histopatología positiva y su resultado inmunohistoquímico



HP+= Histopatología positiva
IHQ+= Inmunohistoquímica positiva
IHQ-= Inmunohistoquímica negativa

Figura 8

PCR de Prolactina con los iniciadores HL033-HL035 mostrando amplificación de 156 pb con la extracción de DNA mediante el método casero y el reactivo comercial

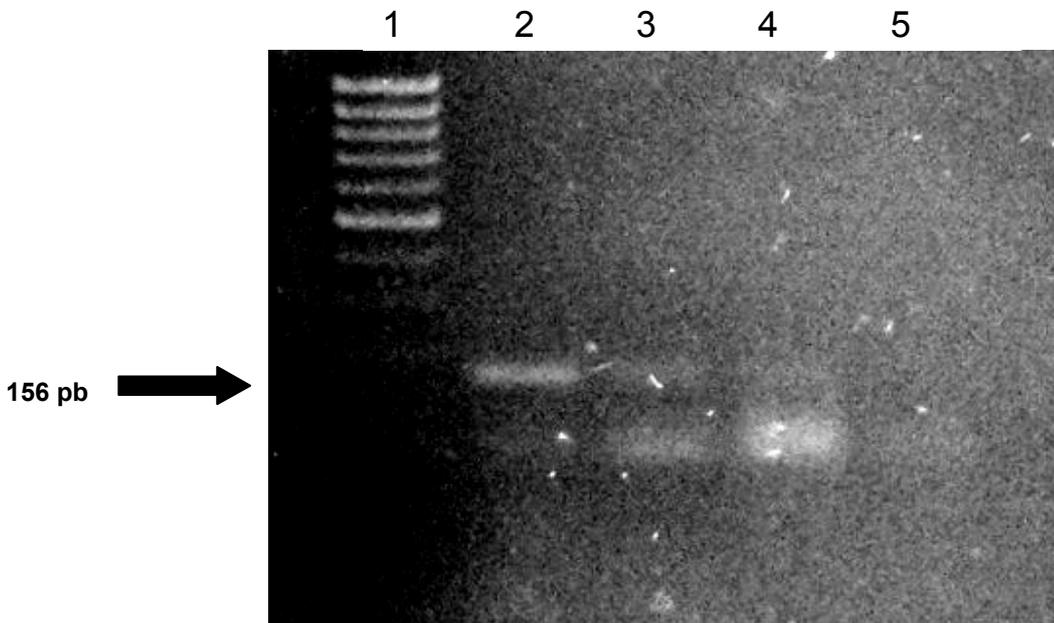


Ilustración de los productos de PCR de prolactina. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2, testigo positivo (DNA de encéfalo fresco), carril 3, DNA con extracción casera, carril 4, extracción con el reactivo comercial (QIAGEN), carril 5, testigo negativo.

Figura 9

Límite de detección de DNA en taquizoitos de *N.caninum* con los iniciadores PN1 y PN2 de la región ITS1

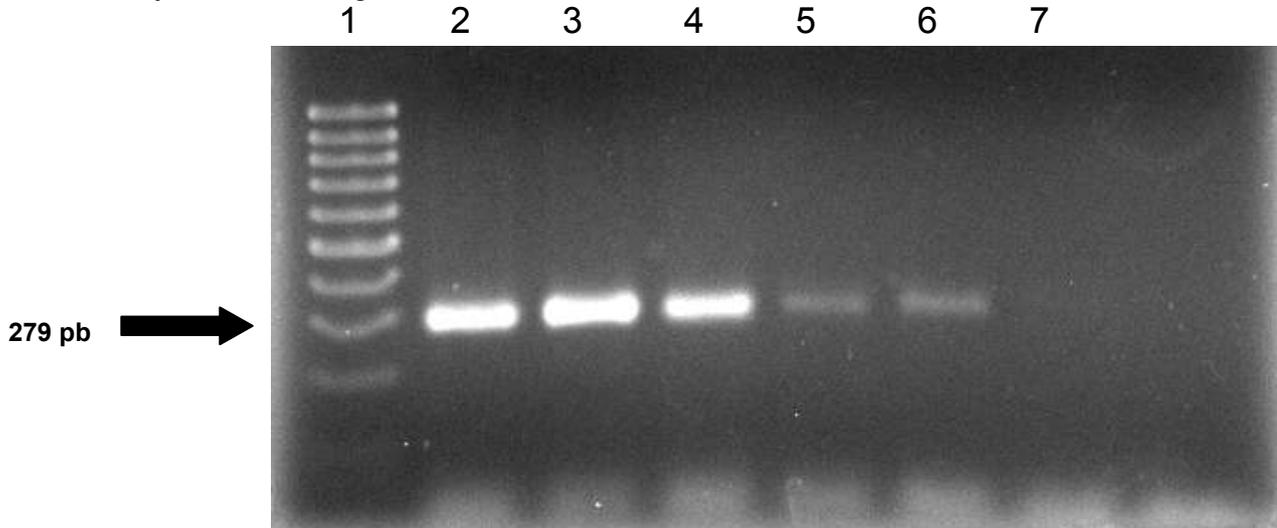
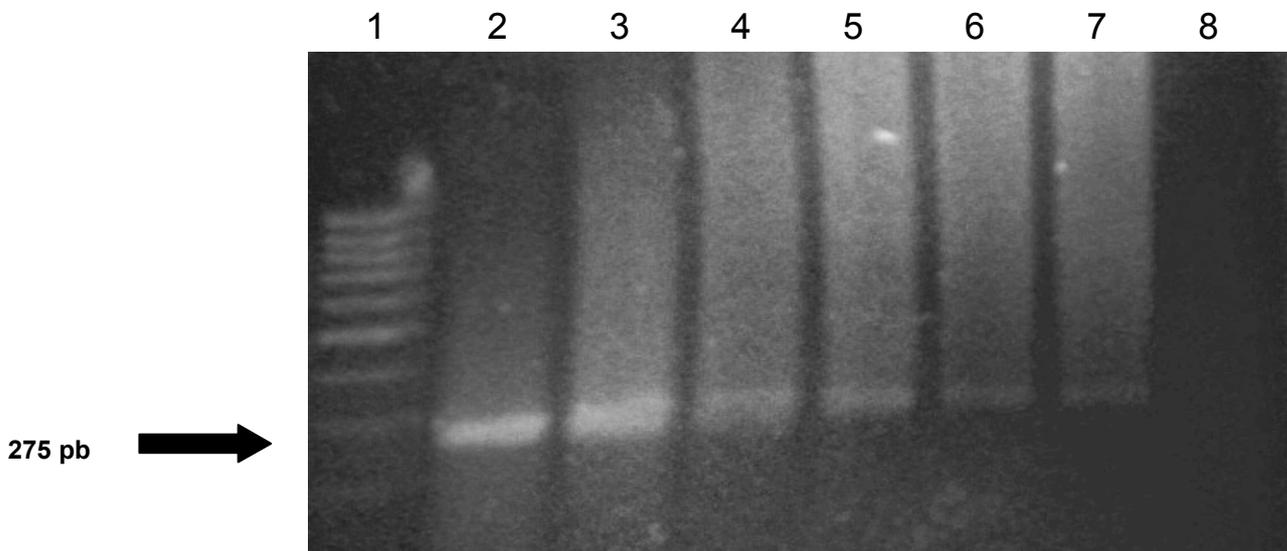


Ilustración del límite de detección de DNA con PCR de ITS1. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2 al 7 (1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg).

Figura 10

Límite de detección de DNA en taquizoitos de *N.caninum* con los iniciadores Np7-Np4 del gen pNc5, que amplifican una banda de 275 pb.



Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2 al 8 (100 ng, 10ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg).

Figura 11

Detección por PCR de DNA de *Neospora caninum* en TFFIP, pertenecientes a los fetos abortados, con los iniciadores PN1-PN2 de la región ITS1

1 2 3 4 5 6 7 8

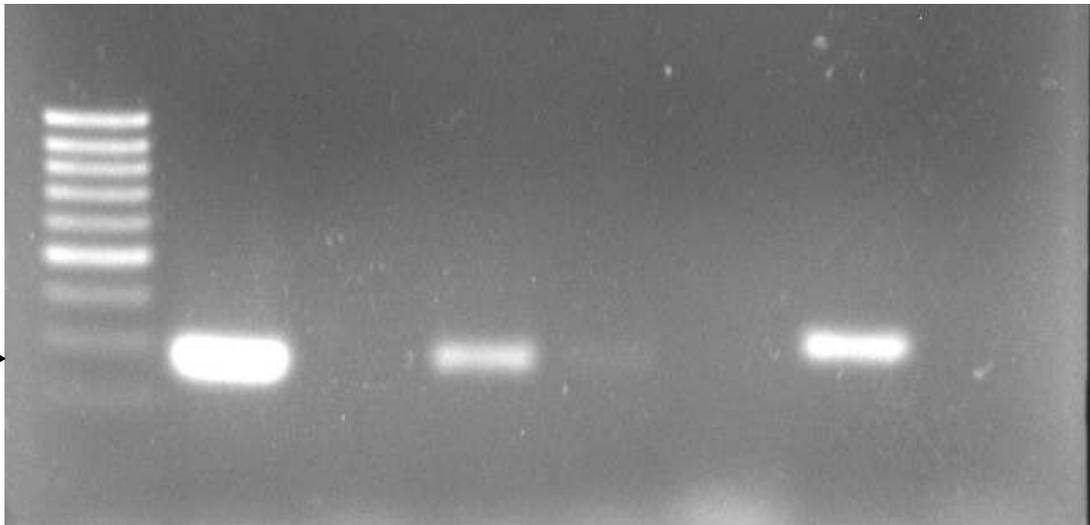
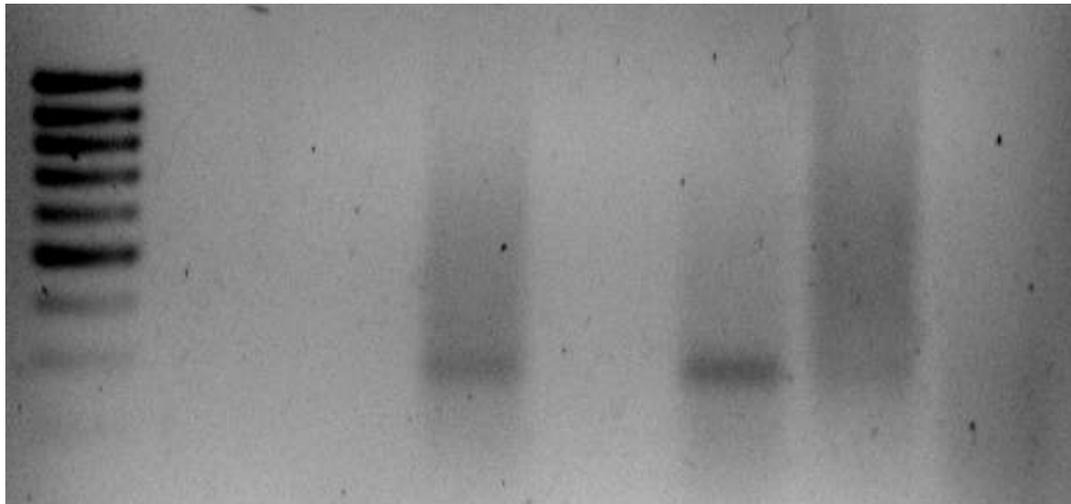


Ilustración de algunos productos de PCR de ITS1. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carril 2 testigo positivo, carril 3 testigo negativo, carril 4,5,7 encéfalos positivos, carril 6 y 8 encéfalos negativos.

Figura 12

Detección por PCR de DNA de *N. caninum* en TFFIP, pertenecientes a los fetos abortados, con los iniciadores Np7-Np4 del gen pNc5

1 2 3 4 5 6 7 8



Producto de PCR de 275 pb. Carril 1 marcador de peso molecular de 100 pb, carril 4, 6, 7 muestran una amplificación positiva, carril 2, 3, 5 y 8 muestran una amplificación negativa.

Cuadro 1

Clasificación por grupos de los fetos con respecto a el resultado histopatológico (HP) e inmunohistoquímico (IHQ).

Grupo	HP e IHQ <i>N.caninum</i>	Número de fetos
1	HP(+) IHQ(+)	21 (43%)
2	HP(-) IHQ (-)	19 (39.58)
3	HP (+) IHQ (-)	8 (16.6)

Cuadro 2

Análisis estadístico utilizando tablas de contingencia de 2X2, para comparar la relación entre los resultados histopatológicos e inmunohistoquímicos.

		Histopatología		
		Positivo	Negativo	
IHQ	Positivo	21	0	21
	Negativo	8	19	27
		29	19	48

$X^2 = 24.46$ $p < 0.005$ Concordancia: 0.83

Cuadro 3

Relación de casos analizados por histopatología, inmunohistoquímica y PCR (pNc5 e ITS1)

# Caso	Histopatología	Inmunohistoquímica	PCR	
			pNC5	ITS1
N98-56A	-	-	-	-
T95-09-133A	+	+	-	+
T95-100	+	-	-	+
T95-09-165A	+	+	+	+
B02-276A	++	+	+	+
T95-09-165B	+	-	-	-
T95-09-160	++	+	+	+
B02-662	+++	+	-	-
T95-09-135A	+	+	+	+
T95-09-111	+	+	+	+
T95-09-116	-	-	-	-
B00-420	++	-	-	-
B04-404	-	-	-	-
B03-10	+	+	+	+
B02-325	+	+	-	+
012	+	+		-
T95-133B	+	-	+	+
T95-09-135B	++	+	-	-
B02-279	+	+	+	+
B02-445	++	+	-	-
T04-09-23	++	+	-	-
T04-09-53	++	+	-	-
T05-01	++	+	+	+
T05-01-2	-	-	-	-
T04-93	-	-	-	-
T95-09-181	+	+	+	+
T04-146	+	+	-	-
T95-09-158	-	-	-	-
B98-369	-	-	-	-
T95-09-105	-	-	-	-
T05-01-EC1314	-	-	-	-
94-0012	+	-	-	-
135	-	-	-	-
S/I	-	-	-	-
63	+	-	-	-
020	-	-	-	-
163A	-	-	-	-
163B	-	-	-	-
T95-09-197	++	+	-	-
T95-09-176	-	-	-	-
017	-	-	-	-
B02-662A	-	-	-	-
T95-09-160	+	+	+	+
B02-872	++	+	+	+
B01-275	-	-	-	-
005	+	-	-	-
T05-01-3	-	-	-	-
T95-09-71	+	-	-	-

Cuadro 4

Frecuencia de fetos positivos por IHQ y PCR ITS1.

Prueba	Interpretación	
	Positivos	Negativos
IHQ	21 (72.41%)	8 (27.58%)
ITS1	15 (51.72%)	14 (48.27%)

L= 2.6364 $p > 0.05$

Cuadro 5

Frecuencia de fetos positivos por IHQ y PCR pNc5.

Prueba	Interpretación	
	Positivos	Negativos
IHQ	21 (72.41%)	8 (27.58%)
pNc5	12 (41.37%)	17 (58.62%)

L= 5.6945 $p < 0.05$

Cuadro 6

Frecuencia de fetos positivos utilizando PCR de ITS1 y pNc5.

PCR	Interpretación	
	Positivos	Negativos
ITS1	15 (71.42%)	6 (28.57%)
pNc5	12 (57.14%)	9 (42.85%)

L= 0.933 p> 0.05