

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE *NEOSPORA CANINUM* EN AVES EN  
SEMILIBERTAD DE LA ZONA CENTRO DE MÉXICO MEDIANTE  
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**GEORGINA ROMERO DOMÍNGUEZ**

Asesores:

MVZ MC Félix D. Sánchez Godoy

MVZ Dra. Elizabeth Morales Salinas



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 HIJO

LEONARDO LUNA ROMERO

QUIEN ES

EL EJE CENTRAL DE MI VIDA.

## AGRADECIMIENTOS

A DIOS POR RODEARME DE GENTE MARAVILLOSA Y LLENAR MI VIDA DE INCONTABLES BENDICIONES.

A MI MAMÁ ROSALÍA DOMÍNGUEZ VEGA POR SU AMOR, CONSEJOS, PACIENCIA, ESTÍMULO, PALABRAS DE ALIENTO, REGAÑOS Y APOYO INCONDICIONAL PUES SIN TI LLEGAR A ESTE MOMENTO Y LOGRAR LA CONCLUSIÓN DE ESTA ETAPA DE MI VIDA NO HUBIERA SIDO POSIBLE.

A MI ESPOSO JOSÉ ALEJANDRO LUNA MORENO POR AMARME Y ACOMPAÑARME EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS LOS DIEZ ÚLTIMOS AÑOS DE MI VIDA.

A MI JEFE Y ASESOR MVZ MC FÉLIX D. SÁNCHEZ GODOY POR TENER LA DEDICACIÓN PARA REALIZAR ESTE TRABAJO, POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS Y ASÍ CONTRIBUIR DE FORMA IMPORTANTE EN MI FORMACIÓN PROFESIONAL.

A LA DOCTORA ELIZABETH MORALES SALINAS POR TODO EL APOYO BRINDADO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

AL DOCTOR NÉSTOR LEDESMA MARTÍNEZ POR DARMER MI PRIMER TRABAJO Y BRINDARME LA POSIBILIDAD DE AMPLIAR MIS CONOCIMIENTOS EN EL ÁREA AVIAR.

A LOS ACADÉMICOS DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA Y EN PARTICULAR A LOS MIEMBROS DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE AVES.

A LOS ANIMALES QUE INVOLUNTARIAMENTE CONTRIBUYERON EN MI FORMACIÓN COMO MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA.

## CONTENIDO

LISTA DE CONTENIDOS	I
LISTA DE FIGURAS	II
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
JUSTIFICACIÓN	11
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
HIPÓTESIS	12
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	17
CONCLUSIÓN	21
REFERENCIAS	22

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. PCR de gradiente para estandarizar el protocolo de PCR de *Neospora caninum* utilizando 44<sup>o</sup>, 46<sup>o</sup> y 48<sup>o</sup>C con diferentes concentraciones de magnesio (2, 2.5 y 3 mM). 29
- FIGURA 2. PCR utilizando los iniciadores PN1 y PN2 mostrando amplificación de 279 pares de bases de la región ITS1 de *Neospora caninum* en el encéfalo de dos aves. 30

## RESUMEN

Georgina Romero Domínguez. Detección de *Neospora caninum* en aves en semilibertad de la zona centro de México mediante reacción en cadena de la polimerasa. (Asesores MVZ MC Félix D. Sánchez Godoy, MVZ Dra. Elizabeth Morales Salinas).

La neosporosis es una enfermedad parasitaria producida por *Neospora caninum* que afecta principalmente al ganado y los perros. Recientemente se ha sugerido que las aves pueden ser huéspedes intermediarios de este parásito por lo cual es importante determinar su presencia en aves mexicanas en semilibertad y si éstas juegan un papel importante dentro del ciclo biológico del parásito. El objetivo de este trabajo fue detectar mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de ADN de *Neospora caninum* en aves en semilibertad de la zona centro de México. La PCR se realizó a partir de encéfalo, miocardio e hígado de 50 aves (150 órganos) criadas en semilibertad que se utilizaron en las prácticas de Metodología Diagnóstica realizadas en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Para ello se amplificó el espaciador interno transcrito 1 (ITS1) de *Neospora caninum*. En 2 de las 50 aves (4%) se detectó ADN de *Neospora caninum*, y de los 150 órganos evaluados, se encontró positividad en 2 encéfalos (1.3%). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran bajo porcentaje de aves infectadas.

## INTRODUCCIÓN

La neosporosis es una enfermedad parasitaria que afecta a diversas especies animales domésticas y silvestres. En bovinos es de gran importancia debido a que ocasiona abortos y mortalidad neonatal, en perros es una enfermedad neuromuscular severa. La neosporosis fue confundida con la toxoplasmosis hasta 1984, cuando se identificó a *Neospora caninum* como agente causal, aislándose por primera vez en 1988.<sup>1,2</sup>

### 1.1 CICLO BIOLÓGICO

*Neospora caninum* es un parásito del phylum Apicomplexa y de la familia Sarcocystidae, está relacionado a otros protozoarios formadores de quistes como *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* sp. y *Besnoitia* sp.<sup>3</sup> El ciclo de vida tiene tres fases infecciosas que están implicadas en la transmisión del parásito: taquizoitos, bradizoítos y ooquistes. Los taquizoitos y los bradizoítos son etapas intermedias (extra-intestinales) que se encuentran en los huéspedes intermediarios.<sup>4</sup> Los taquizoitos son de forma ovoide, semilunar o globular, miden aproximadamente 6 X 2  $\mu\text{m}$ , los bradizoítos tienen forma semilunar, miden de 7 a 8 X 2  $\mu\text{m}$  y se encuentran dentro de quistes que tienen forma redonda a oval que miden hasta 107  $\mu\text{m}$  de diámetro y se encuentran principalmente en el sistema nervioso central. Algunos tejidos extraneurales, especialmente músculos pueden contener quistes.<sup>5,6</sup> Los ooquistes son esféricos o semiesféricos, miden de 10 a 11  $\mu\text{m}$  de diámetro y contienen dos esporoquistes con cuatro esporozoítos; son resistente al medio ambiente y se excretan como ooquistes no esporulados en las heces de



los caninos<sup>7, 8</sup> y por condiciones medio ambientales esporulan siendo la fase infectante para los huéspedes intermediarios.<sup>9</sup>

## 1.2 HUESPEDES

El perro doméstico (*Canis domesticus*)<sup>8</sup>, el dingo australiano (*Canis lupus dingo*)<sup>7</sup>, el coyote (*Canis latrans*)<sup>10</sup> y el lobo gris (*Canis lupus*)<sup>11</sup> son huéspedes definitivos de *Neospora caninum* ya que en ellos se realiza la reproducción sexual del parásito en el intestino con lo cual se eliminan ooquistes a través de sus heces que pueden contaminar el alimento y agua que consumen los huéspedes intermediarios como son las vacas, ovejas, cabras, búfalos, caballos, bisontes, y venados cola blanca entre las más comunes.<sup>12</sup> En estas especies se lleva a cabo la reproducción asexual del parásito formando los taquizoitos y bradizoitos tisulares. Los perros también pueden adquirir la parasitosis consumiendo ooquistes eliminados por otros perros.

Los ooquistes son la clave en la epidemiología de esta enfermedad debido a que son resistentes al medio ambiente y pueden ser viables por largos periodos de tiempo<sup>13</sup>

## 1.3 TRANSMISIÓN

*Neospora caninum* se transmite de manera horizontal y vertical. La transmisión horizontal solo se ha documentado en los huéspedes definitivos ya que un perro puede eliminar ooquistes e infectar a otros perros o bien se pueden infectar por la ingestión de tejidos con quistes o taquizoitos de *Neospora caninum* sin embargo,

la transmisión vertical es la más eficiente y se puede presentar en los huéspedes definitivos e intermediarios y pasar de una generación a otra. Esta es la vía de transmisión más común en los bovinos.<sup>14-17</sup>

## 1.4 SIGNOS CLÍNICOS

Los signos clínicos solo se observan en los huéspedes definitivos e intermediarios que son infectados de manera vertical. Las crías de los perros pocas veces desarrollan signos clínicos y cuando se presentan se observa parálisis ascendente de los miembros pélvicos. Los becerros infectados de manera transplacentaria desarrollan signos nerviosos, como incapacidad para levantarse, flexión o hiperextensión de extremidades anteriores o posteriores y el examen neurológico puede revelar ataxia, disminución del reflejo patelar y pérdida de la propiocepción consciente. Puede observarse exoftalmia o una apariencia asimétrica de los ojos y ocasionalmente defectos al nacimiento que incluyen hidrocefalia y reducción de la médula espinal.<sup>18</sup> Desafortunadamente, la mayoría de los becerros infectados vía placentaria, nacen clínicamente sanos pero persistentemente infectados.

El principal signo en animales adultos (vacas) es el aborto y este puede presentarse en cualquier momento de la gestación pero es más frecuente entre el quinto y sexto mes; el feto puede morir en el útero, ser abortado, reabsorbido o momificado.<sup>19</sup>

En pollitos inoculados experimentalmente *in ovo*, se observaron signos neurológicos como falta de coordinación, movimientos de pedaleo, parálisis de

miembros posteriores, desplazamiento en círculos, artritis, inflamación, enrojecimiento y ulceración de la piel que cubre las articulaciones.<sup>20</sup>

## 1.5 DIAGNÓSTICO

Desde el descubrimiento de *Neospora caninum*, muchas pruebas diagnósticas han sido desarrolladas para ayudar a detectar la infección por este parásito. Estas pruebas incluyen Inmunohistoquímica, Inmunofluorescencia indirecta, Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas, Aglutinación directa, Análisis de Western blot y Reacción en Cadena de la Polimerasa.

### 1.5.1 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO INDIRECTOS

Se basan en la detección de anticuerpos anti-*Neospora caninum* en suero, líquido cefalorraquídeo o en cavidades serosas. 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 tanto el punto de corte puede ser seleccionado arbitrariamente, lo que determina una sensibilidad y una especificidad para una aplicación en particular. Para el caso de las aves la principal prueba serológica que se ha utilizado para detectar anticuerpos contra *Neospora caninum* es la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) que se considera la más específica al no tener reacción cruzada o ser mínima con anticuerpos anti-*Toxoplasma gondii* y nula contra *Cryptosporidium*. El título de anticuerpos para considerar positiva a un ave es muy variable y se encuentra en un rango de 1:25 a 1:400.<sup>20-24</sup>

## 1.5.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DIRECTOS

Se basan en la identificación del parásito y la presencia de este en los tejidos llegando al diagnóstico definitivo de neosporosis.

### HISTOPATOLOGÍA

El examen histopatológico de los tejidos afectados es esencial para el diagnóstico de neosporosis, ya que se pueden detectar lesiones características del parásito y la presencia de taquizoitos y quistes parasitarios conteniendo bradizoítos. Sin embargo, debido a que *Neospora caninum* es estructuralmente semejante a *Toxoplasma gondii* es recomendable emplear técnicas más sensibles como la inmunohistoquímica. Para el caso de las aves solo se informan lesiones en embriones de pollo y en pollitos infectados *in ovo* a los siete días de incubación por la cavidad alantoidea de manera experimental, observando una mortalidad embrionaria de hasta el 50%. Las lesiones se observaron en la membrana corioalantoidea, hígado, encéfalo, corazón y se caracterizan por necrosis multifocal e inflamación histiocítica con taquizoitos intralesionales<sup>20, 25</sup> Adicionalmente en un *Ara choloferus* y un *Amazona aestiva* se observaron quistes parasitarios en músculo esquelético de la región pericloacal y del cuello respectivamente sin encontrar lesiones asociadas a la presencia de los parásitos.<sup>24</sup>

## INMUNOHISTOQUIMICA (IHQ)

Este diagnóstico se basa en la identificación de *Neospora caninum* en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina. El método de inmunohistoquímica del complejo Streptoavidina-Biotina-Peroxidasa es el más utilizado. En las aves este método ha demostrado su utilidad al detectar taquizoitos en encéfalo, bazo, corazón e hígado de embriones de pollo y en pollitos infectados experimentalmente a los siete días de incubación por la cavidad alantoidea, utilizando anticuerpos primarios policlonales hechos en becerro y ratón. También se informa la presencia de *Neospora caninum* por inmunohistoquímica en pulmón, corazón, sistema nervioso central, hígado, bazo y riñón de palomas infectadas experimentalmente así como en el músculo esquelético de aves exóticas.<sup>20, 23,24.</sup>

## REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de PCR, es capaz de detectar ADN de *Neospora caninum* en tejidos, líquido cefalorraquídeo, sangre y heces de los animales infectados y se basa principalmente en la amplificación específica de la región genómica pNc5 y el ITS1. La región del ITS1 es usada para estudios filogenéticos y es una zona ideal para el desarrollo de técnicas moleculares, debido a que está presente en un alto número de copias, exhibe variedad inter género y es altamente conservada entre especies. Esta técnica se ha utilizado de manera exitosa para detectar la presencia de este parásito en pollos (*Gallus gallus*), huevos embrionados y aves silvestres (*Pica pica*, *Buteo buteo*) amplificando una porción de la región genómica pNc5 y en el gorrión (*Passer domesticus*) utilizando la región ITS1.<sup>20, 21, 26,27</sup>

## 1.6 IMPACTO ECONOMICO

*Neospora caninum* es reconocida como una causa importante de pérdidas económicas en la industria de la leche y carne.<sup>11, 28</sup>

En Inglaterra se considera que se producen 6000 abortos anuales debido a *N. caninum* y la pérdida de cada becerro representa 800 dólares, por lo tanto se estiman perdidas por aproximadamente 4.8 millones de dólares. En California, EU y Australia se estiman pérdidas por 35 y 85 millones de dólares respectivamente

29-32

## 1.7 NEOSPOROSIS EN MÉXICO

El primer informe 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 confundida con *Hammondia pardalis*.<sup>33</sup> Posteriormente se informaron fetos con lesiones compatibles a neosporosis en Torreón, Coahuila.<sup>34</sup> Morales *et. al.* publicaron el primer aborto bovino ocasionado por *Neospora caninum* por histopatología e inmunohistoquímica.<sup>35</sup> En un estudio más amplio analizando 211 fetos de las principales cuencas lecheras mexicanas se encontraron lesiones características de neosporosis en 73 fetos (35%), 41 tejidos de estos fetos fueron positivos por inmunohistoquímica.<sup>36</sup> 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.<sup>37</sup> Sánchez *et. al.*<sup>38</sup> realizó un estudio serológico de neosporosis en perros de México, comparando

la seropositividad entre perros de ciudad y residentes de establos, y en vacas de establo con o sin perros observando que la seropositividad fue mayor en perros residentes de establos, con respecto a los perros de ciudad y la seropositividad de vacas fue mayor en establos con perros que sin ellos. Estos datos concuerdan con otro estudio serológico en perros realizado en Aguascalientes donde se encontró seroprevalencia de 41% en perros que comparten espacios con el ganado lechero, mientras que los perros de las zonas urbanas mostraron 20% seroprevalencia<sup>39</sup> En un muestreo realizado en Coahuila, Chihuahua, Hidalgo, Querétaro, Jalisco la prevalencia de abortos causados por *Neospora caninum* fue de 42%.<sup>40</sup> Todos estos estudios demuestran que *Neospora caninum* está ampliamente difundido en el territorio nacional.

## 1.8 NEOSPOROSIS EN AVES

En estudios recientes realizados en Brasil, se encontraron anticuerpos contra *Neospora caninum* en el 23.5% de 200 aves *free-range* y se detectó ADN de *Neospora caninum* en 6 de 10 pollos seropositivos.<sup>21</sup> En otro estudio, se inocularon de forma experimental pollitos de más de una semana de edad con taquizoitos de *Neospora caninum* por vía intraperitoneal los cuales desarrollaron una infección transitoria, y no se demostraron anticuerpos o parásitos a los 60 días post-inoculación, sin embargo, en huevos embrionados de pollo se produjo infección patente y un perro fue alimentado con las membranas corioalantoideas de estos embriones provocándole la infección.<sup>20</sup> Actualmente se confirmó la

susceptibilidad de embriones de pollo de engorda a la infección por *Neospora caninum*.<sup>25</sup>

En otro estudio, se encontraron anticuerpos contra *Neospora caninum* en el 39.5% de 1324 de pollos *free-range* del continente Americano, con mayor prevalencia en pollos de Nicaragua, lo cual indicó una amplia exposición de este tipo de animales al parásito.<sup>22</sup>

Mediante infecciones experimentales exitosas con taquizoitos de *Neospora caninum* en palomas (*Columba livia*), se demostró que son probables huéspedes intermediarios del parásito debido a que se detectaron anticuerpos, lesiones y parásitos en esta especie.<sup>23</sup>

En una guacamaya rojo y verde (*Ara chloropterus*) y en un Loro frente azul (*Amazona aestiva*), se encontraron quistes de *Neospora caninum* mediante inmunohistoquímica en la musculatura alrededor de la cloaca y en la musculatura cervical, respectivamente.<sup>24</sup>

En cuanto a las infecciones naturales en aves silvestres, en un trabajo se observó ADN de *Neospora caninum* en encéfalo de urracas, (*Pica pica*) y ratonero común (*Buteo buteo*), incluyendo estas especies como huésped natural intermedio para este protozoario.<sup>27</sup> Adicionalmente en otro estudio, se encontró ADN de *Neospora caninum* en 3 de 40 gorriones (*Passer domesticus*) en el noreste de Brasil.<sup>26</sup>



## JUSTIFICACIÓN

La neosporosis está ampliamente distribuida en bovinos y perros en México y se sabe que el perro es el huésped definitivo de *Neospora caninum*, el cual transmite la enfermedad a los huéspedes intermediarios, así mismo en los últimos años se ha sugerido que las aves pueden ser huéspedes intermediarios de este parásito; Por lo cual es importante determinar la presencia del protozoario en aves mexicanas en semilibertad y si éstas pueden jugar un papel importante dentro del ciclo biológico del parásito ya que es común observar que los perros consumen la mortalidad avícola y las aves se alimentan en el suelo en donde pueden estar presentes los ooquistes de *Neospora caninum*.

## OBJETIVO GENERAL

- Detectar mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de ADN de *Neospora caninum* en aves en semilibertad de la zona centro de México.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Estandarizar la extracción y purificación de ADN de encéfalo, miocardio e hígado de aves.
2. Adecuar la técnica de PCR para la detección de ADN de *Neospora caninum* en tejidos de aves utilizando los iniciadores para la región genómica ITS1.
3. Realizar la técnica de PCR en encéfalo, miocardio e hígado de las aves.
4. Determinar la frecuencia de aves positivas por PCR.

## HIPÓTESIS

Se detectará *Neospora caninum* en aves en semilibertad de la zona centro de México.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó PCR a partir de encéfalo, miocardio e hígado de 50 aves criadas en semilibertad provenientes de la zona centro de México, las cuales se utilizaron en las prácticas de Metodología Diagnóstica realizadas en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

### 1. EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó la lisis mecánica de corazón, encéfalo e hígado de cada una de las aves utilizando un mortero estéril para obtener un macerado, se diluyó 1:20 con PBS (Solución amortiguadora de fosfatos) estéril. En un tubo eppendorf se agregaron 250 $\mu\text{l}$  del macerado, 250 $\mu\text{l}$  de Solución de Lisis (TRIS<sup>A</sup>/EDTA<sup>B</sup>/SDS<sup>C</sup>) y 12.5  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K<sup>D</sup>, las muestras se incubaron en el recirculador<sup>E</sup> toda la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente se realizó la purificación de ADN agregando un volumen de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico 25/24/1<sup>F</sup>, se mezcló con un vortex<sup>G</sup> por 15 segundos y se centrifugó<sup>H</sup> a 12 500 RPM por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se tomó el sobrenadante y a este se le agregó un volumen de Cloroformo/Alcohol Isoamílico

---

<sup>A</sup> TRIS J.T.Baker Phillipsburg, NJ 08865 Ph (908) 859-2151

<sup>B</sup> EDTA Research Organics 4353 E 49th St. Cleveland, Ohio 44125 USA. Catálogo 9575E

<sup>C</sup> SDS Research Organics 4353 E 49th St. Cleveland, Ohio 44125 USA. Catálogo 9020L

<sup>D</sup> Fermentas 798 Cromwell Park Drive Glern Burnie MD 21061, USA. Catálogo EO0491

<sup>E</sup> Pharmacia Biotech, MultiTemp III

<sup>F</sup> Research Organics 4353 E 49th St. Cleveland, Ohio 44125 USA. Catálogo 0641P

<sup>G</sup> Daigger vortex Genie 2

<sup>H</sup> Sorvall Biofuge Fresco

24/1<sup>I</sup> se mezcló con vortex por 15 segundos y se centrifugó a 12 500 RPM por 5 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y a éste se le agregaron dos volúmenes de Isopropanol absoluto<sup>J</sup> se mezcló por inversión y se incubó a -20°C por 30 minutos.

Pasado este tiempo se centrifugo a 13 500 RPM por 10 minutos a 4°C, se decantó el alcohol y se lavó la pastilla de DNA con 250µl de alcohol al 70%<sup>K</sup> se centrifugo a 13 500 RPM por 10 minutos a 4°C se decantó el sobrenadante y se secó la pastilla durante una hora a temperatura ambiente. La patilla se hidrató con 100µl de Agua inyectable estéril<sup>L</sup> y se calentó en el termoblock<sup>M</sup> durante 10 minutos a 55°C.

## 2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó PCR utilizando los iniciadores<sup>N</sup> PN1 sentido (5'-CTCCTTCGGAGAGGGGTA-3') y PN2 contrasentido (5'-TCTTCCCTCAAACGCTATC-3'), complementarias a las regiones conservadas 18S y 5.8S rRNA que amplifican un fragmento de 279 pares de bases del espaciador interno transcrito 1 (ITS1) de *Neospora caninum*. La reacción de PCR fue de 20µl utilizando 2 µl de Buffer Taq (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10X), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.5 µl de Taq polimerasa (5U/ µl)<sup>O</sup>, 0.4 µl de dNTP's (10mM)<sup>P</sup>, 1 µl de Iniciadores

---

<sup>I</sup> Cloroformo: Caledon Laboratories Georgetown, Ont. Canadá. Code 3000-1/ Alcohol Isoamílico: Sigma P.O. Box 14508 St. Louis, MO 63178 USA. Catálogo I-9392

<sup>J</sup> Sigma P.O. Box 14508 St. Louis, MO 63178 USA. Catálogo I9516.

<sup>K</sup> AZ Vicente Guerrero No.295 Col. Agua Blanca Industrial, Zapopan, Jalisco.

<sup>L</sup> Laboratorios PISA SA de CV Calle 7 No.1308, Zona industrial Guadalajara Jalisco México.

<sup>M</sup> Labnet D1100.

<sup>N</sup> Sigma Calle 6 Norte No.107, Parque Industrial Toluca 2000 50200 Toluca, México.

<sup>O</sup> Fermentas 798 Cromwell Park Drive Glerm Burnie MD 21061, USA. Catálogo #EP0402.

<sup>P</sup> 798 Cromwell Park Drive Glerm Burnie MD 21061, USA. Catálogo R0192.

(10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l de Tritón (2%)<sup>Q</sup>, 1  $\mu$ l de BSA (3 mg/ml)<sup>R</sup> y 6.7  $\mu$ l de Agua estéril. Para correr la reacción se utilizó un termociclador<sup>S</sup> programado con un ciclo de desnaturalización inicial de 94°C por 8 minutos y 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 46°C por 1.5 minutos, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Se colocó un marcador de peso molecular de 1kb<sup>T</sup>, se tomaron 5  $\mu$ l de la reacción y se mezclaron con 1  $\mu$ l de Buffer muestra<sup>U</sup> se homogenizaron y fueron cargados en un gel de agarosa al 2%<sup>V</sup> y se sometieron a electroforesis horizontal<sup>W</sup> por 30 minutos a 90 voltios y posteriormente fueron teñidos con bromuro de etidio<sup>X</sup> y observados bajo luz ultravioleta<sup>Y</sup>

---

<sup>Q</sup> Sigma Calle 6 Norte No.107, Parque Industrial Toluca 2000 50200 Toluca, México Catálogo T8787.

<sup>R</sup> Sigma Chemical CO St. Louis Mo. 63178 USA.

<sup>S</sup> ThermoHybaid PCRExpress.

<sup>T</sup> Fermentas 798 Cromwell Park Drive Glern Burnie MD 21061, USA. Catálogo #SM0313

<sup>U</sup> Fermentas 798 Cromwell Park Drive Glern Burnie MD 21061, USA. Catálogo #R0611.

<sup>V</sup> Promega Corporation 608-274-4330. Madison, WI 53711-5399 USA.

<sup>W</sup> Cleaver Scientific, Ltd, Rugby, Warwickshire, UK.

<sup>X</sup> Sigma Chemical CO St. Louis Mo. 63178 USA.

<sup>Y</sup> UVP Modelo 20, Upland CD 91786 USA.

## RESULTADOS

De las 50 aves que se incluyeron en el estudio, se realizó la extracción de ADN a 150 órganos (encéfalo, corazón e hígado) que fueron trabajados de manera individual (Cuadro1). El ADN obtenido se utilizó para la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica un segmento de 279 pares de bases del ITS1 de *Neospora caninum* utilizando los iniciadores PN1 y PN2. De las 50 aves, en 2 (4%) se detectó ADN de *Neospora caninum*. De los 150 órganos evaluados, se encontró ADN de *Neospora caninum* en 2 encéfalos lo que representa el 1.3% de las muestras examinadas (Figuras 1 y 2).

## DISCUSIÓN

La infección por *Neospora caninum* ha sido extensamente informada en mamíferos principalmente en bovinos y perros, pero solo existen algunos informes en aves domésticas y silvestres de los cuales la mayoría han sido infecciones experimentales. En este estudio se trabajó con aves domésticas en semilibertad encontrando el 4% de las aves positivas. Este porcentaje se considera bajo y es similar a la frecuencia observada por Costa *et al*<sup>21</sup> quien realizó un estudio serológico en Brasil utilizando la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFAT) en 400 aves (*Gallus gallus*) de seis meses a dos años de edad; de las cuales 200 eran aves comerciales criadas en confinamiento y 200 criadas en semilibertad, encontrando 1.5% y 23.5% de aves positivas respectivamente. De 10 aves seropositivas se realizó PCR y se detectó ADN de *Neospora caninum* en 6 aves. Sin embargo, es difícil establecer un porcentaje debido a que solo se realizó PCR de 10 aves y no establece si fueron aves confinadas o en semilibertad. La frecuencia en la detección de *Neospora caninum* también se ha estudiado en aves silvestres en España como lo hizo Darwich *et al*<sup>27</sup> quien obtuvo el encéfalo de 201 aves silvestres muertas y realizó PCR para detectar *Neospora caninum* y encontró ADN del parásito en el 1.5% (3/201) de los casos provenientes de 2 urracas (*Pica pica*) y un ratonero común (*Buteo buteo*).

Asimismo Gondim *et al*<sup>26</sup> capturó 293 gorriones de los cuales realizó PCR anidado de 40 aves y 25% (10/40) resultaron positivas para la subfamilia Toxoplasmatinae. Secuenció el producto de PCR y encontró que el 7.5% (3/40) coincide con

*Neospora caninum*. Los resultados del presente estudio y los descritos en la literatura, sugieren que la prevalencia de *Neospora caninum* en aves domésticas y silvestres es baja y que tal vez no juegan un papel importante como huéspedes intermediarios aunque al haber informes de aves infectadas naturalmente, no pueden descartarse como un posible factor de riesgo. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios en aves en semilibertad que convivan con perros y vacas que presenten abortos por neosporosis para poder evaluar de una mejor manera la contribución de las aves en el ciclo biológico del parásito, esto debido a que en este estudio no se contó con datos exactos de su procedencia y si tenían contacto con perros y vacas.

También se han realizado pruebas serológicas para detectar aves expuestas a *Neospora caninum* encontrando una alta seroprevalencia, como lo observado por Costa<sup>21</sup> y Martins *et. al.*<sup>22</sup> quienes recolectaron el suero de 1324 aves criadas en semilibertad provenientes del continente americano y los analizó mediante IFAT encontrando anticuerpos contra *Neospora caninum* en el 39.5% de estas. La mayor prevalencia se observó en Nicaragua con 83.6%. En México se muestrearon 97 aves y el 18.5% fueron positivas sin embargo, los resultados de estas pruebas solo demuestran que posiblemente el ave estuvo en contacto en algún momento de su vida con el parásito pero no demuestran la presencia de *Neospora caninum* en los tejidos como se sí se demostró en el presente estudio. Asimismo se ha demostrado que las aves pueden cursar con una infección transitoria como lo describió Furuta *et. al.*<sup>20</sup> al inocular pollitos de siete días de edad y a los quince días post inoculación, realizó la eutanasia encontrando altos



títulos de anticuerpos contra *Neospora caninum* y detectó parásitos mediante inmunohistoquímica en diversos tejidos, sin embargo, a los 60 días post infección encontró títulos negativos y observó ausencia de parásitos mediante inmunohistoquímica por lo que se concluyó que las aves desarrollan una infección transitoria.

En el presente estudio el ADN del parásito solo se identificó en el encéfalo. Esto concuerda con lo informado en la literatura para otras aves.<sup>21</sup> y demuestra que el parásito tiene tropismo por el sistema nervioso central en todas las especies.

En las aves de este trabajo no se observaron lesiones macroscópicas pero existen informes en los que se describe la presencia de quistes parasitarios de *Neospora caninum* en la musculatura cervical y pericloacal en un *Amazona aestiva* y un *Ara chloropterus* respectivamente.<sup>24</sup>

Los resultados obtenidos en el presente demuestran bajo porcentaje de aves infectadas con *Neospora caninum* como se comentó anteriormente y aunque son aves en semilibertad, no se tienen datos que aseguren un contacto con perros y vacas, sin embargo, los informes en la literatura sugieren fuertemente que las aves son huéspedes intermediarios de este parásito ya que se ha logrado transmitir el protozooario a los perros a través del consumo de membranas corioalantoideas de embriones de pollo infectadas con *Neospora caninum*. Estos perros eliminaron ooquistes a través de sus heces.<sup>20</sup> En estudios epidemiológicos realizados en Holanda, se describieron como factores de relevancia biológica potencial en la transmisión de neosporosis en el ganado, la presencia de perros y

aves y se sugiere que las aves pueden jugar un papel como huéspedes intermediarios y contagiar al perro si se alimenta con las mismas<sup>41</sup> y en Italia se observó que la prevalencia de anticuerpos contra *Neospora caninum* es mayor en bovinos que conviven con aves domésticas que en los que no conviven con estas.<sup>42</sup>

## CONCLUSIÓN

En este estudio se trabajó con aves domésticas en semilibertad encontrando el 4% (2/150) de casos positivos a *Neospora caninum* partir de encéfalo lo que concuerda con lo informado en la literatura para otras aves y demuestra que el parásito tiene tropismo por el sistema nervioso también en las aves. Este porcentaje se considera bajo lo que sugiere que las aves tal vez no juegan un papel importante como huéspedes intermediarios aunque al haber informes de aves infectadas naturalmente, no pueden descartarse como un posible factor de riesgo. Sin embargo, es necesario realizar otros estudios en aves en semilibertad que convivan con perros y vacas para poder evaluar de una mejor manera la participación de las aves en el ciclo biológico del parásito, debido a que en este estudio no se contó con datos exactos de su procedencia y si tenían contacto con el huésped definitivo e intermediarios del parásito.

## REFERENCIAS

1. Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J, 1984. Unidentified cyst-forming sporozoon causing encephalomyelitis and myositis in dogs. *Z. Parasitenkd.* 70: 271–274.
2. Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A, 1988. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 192: 1269–1285.
3. Dubey JP, 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet. Parasitol.* 84: 349–367.
4. Dubey JP, Barr BC, Barta JR, Bjerkås I, Bjorkman C, Blagburn BL, Bowman DD, Buxton D, Ellis J T, Gottstein B, Hemphill A, Hill DE, Howe DK, Jenkins MC, Kobayashi Y, Koudela B, Marsh AE, Mattsson JG, McAllister MM, Modry D, Omata Y, Sibley LD, Speer CA, Trees AJ, Uggla A, Upton SJ, Williams DJL, and Lindsay DS, 2002. Redescription of *Neospora caninum* and its differentiation from related coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32:929–946.
5. Dubey JP, Sreekumar C, Knickman E, Miska KB, Vianna MCB, Kwok OCH, Hill DE, Jenkins MC, Lindsay DS, and Greene CE, 2004. Biologic, morphologic, and molecular characterization of *Neospora caninum* isolates from littermate dogs. *Int. J. Parasitol.* 34:1157–1167.
6. Peters M, Lütkefels E, Heckerroth AR, and Schares G, 2001. Immunohistochemical and ultrastructural evidence for *Neospora caninum* tissue

cysts in skeletal muscles of naturally infected dogs and cattle. *Int. J. Parasitol.* 31:1144–1148.

7. Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE, 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 34: 159-161

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

9. Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB, 1999. Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 82:327–333.

10. King JS, Slapeta J, Jenkins DJ, Al-Qassab SE, Ellis JT, Windsor PA, 2010. Australian dingoes are definitive host of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 40: 945-950.

11. Dubey JP, Jenkins MC, Rajendran C, Miska K, Ferreira LR, Martins J, Kwok OCH, Choudhary S, 2011. Gray wolf (*Canis lupus*) is a natural definitive host for *Neospora caninum*. *Vet. Parasitol.* 181: 382-387.

12. Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM, 2007. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:323–367.

13. Uzeda RS, Costa KS, Santos SL, Pinheiro AM, de Almeida MAO, McAllister MM, Gondim LFP, 2007. Loss of infectivity of *Neospora caninum* oocysts maintained for a prolonged time. *Korean J. Parasitol.* 45: 295-299.

14. Williams DJL, Hartley CS, Björkman C, Trees AJ, 2009. Endogenous and exogenous transplacental transmission of *Neospora caninum* – how the route of transmission impacts on epidemiology and control of disease. *Parasitology* 136: 1895–1900.
15. McCann CM, McAllister MM, Gondim LFP, Smith RF, Cripps PJ, Kipar A, Williams DJL, Trees AJ, 2007. *Neospora caninum* in cattle: experimental infection with oocysts can result in exogenous transplacental infection, but not endogenous transplacental infection in the subsequent pregnancy. *Int. J. Parasitol.* 37: 1631–1639.
16. Serrano-Martínez E, Ferre I, Martínez A, Osoro K, Mateos-Sanz A, del-Pozo I, Aduriz G, Tamargo C, Hidalgo CO, Ortega-Mora LM, 2007. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology* 67: 1175–1184.
17. Osoro K, Ortega-Mora LM, Martínez A, Serrano-Martínez E, Ferre I, 2009. Natural breeding with bulls experimentally infected with *Neospora caninum* failed to induce seroconversion in dams. *Theriogenology* 71:639–642.
18. Dubey JP, 1999. Recent Advances in *Neospora* and neosporosis. *Vet Parasitol.* 84:349-367.
19. Ghanem ME, Suzuki T, Akita M, Nishibori M, 2009. *Neospora caninum* and complex vertebral malformation as possible causes of bovine fetal mummification. *Can. Vet. J.* 50: 389–392.

20. Furuta PI, Mineo TWP, Carrasco AOT, Godoy GS, Pinto AA, Machado RZ, 2007. *Neospora caninum* infection in birds: experimental infections in chicken and embryonated eggs. *Parasitology* 134: 1931-1939.
21. Costa KS, Santos SL, Uzêda RS, Pinheiro AM, Almeida MAO, Araújo FR, McAllister MM, Gondim LFP, 2008. Chickens (*Gallus domesticus*) are natural intermediate hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 38: 157-159.
22. Martins J, Kwok OCH, Dubey JP, 2011. Seroprevalence of *Neospora caninum* in free-range chickens (*Gallus domesticus*) from the Americas, *Vet. Parasitol.* 182: 349-351.
23. Mineo TWP, Carrasco AOT, Marciano JA, Werther K, Pinto AA, Machado RZ, 2009. Pigeons (*Columba livia*) are a suitable experimental model for *Neospora caninum* infections in birds. *Vet. Parasitol.* 159: 149-153.
24. Mineo TWP, Carrasco AOT, Raso TF, Werther K, Pinto AA, Machado RZ, 2010. Survey for natural *Neospora caninum* infection in wild and captive birds. *Vet. Parasitol.* 2011 Mayo 22. Artículo publicado electrónicamente. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171100375X>
25. Mansourian M, Khodakaram-Tafti A, Namavari M, 2009. Histopathological and clinical investigations in *Neospora caninum* experimentally infected broiler chicken embryonated eggs. *Vet. Parasitol.* 166: 185-190.
26. Gondim LSQ, Abe-Sandes K, Uzêda RS, Silva MSA, Santos SL, Mota RA, Vileta SMO, Gondim LFP, 2010. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in

sparrows (*Passer domesticus*) in the Northeast of Brazil. Vet. Parasitol. 168:121-124.

27. Darwich L, Cabezón O, Echeverría I, Pabón M, Marco I, Molina-López R, Alarcia-Alejos O, López-Gatius F, Lavín S, Almería S, 2012. Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds. Vet. Parasitol. 183: 377-381.

28. Dubey JP, 2003. Neosporosis in cattle. J. Parasitol. 89 suppl., S42–S56.

29. Davison HC, Otter A, Trees AJ. 1999. Significance of *Neospora caninum* in British dairy cattle determined by estimation of seroprevalence in normally-calving and aborting cattle. Int. J. Parasitol. 29:1189-1194.

30. Anderson ML, Blanchard PC, Barr BC, et al.: 1991, *Neospora* like protozoan infection as a major cause of abortion in California dairy cattle. J Am Vet Med Assoc 198:241 -244.

31. Trees AJ, Davison HC, Innes EA, Wastling JM, 1999. Towards evaluating the economic impact of bovine neosporosis. Int. J. Parasitol. 29: 1195-1200.

32. Brittain R, 2000. A review of current reports on bovine neosporosis. AETE Newsletter. 11: 8-10.

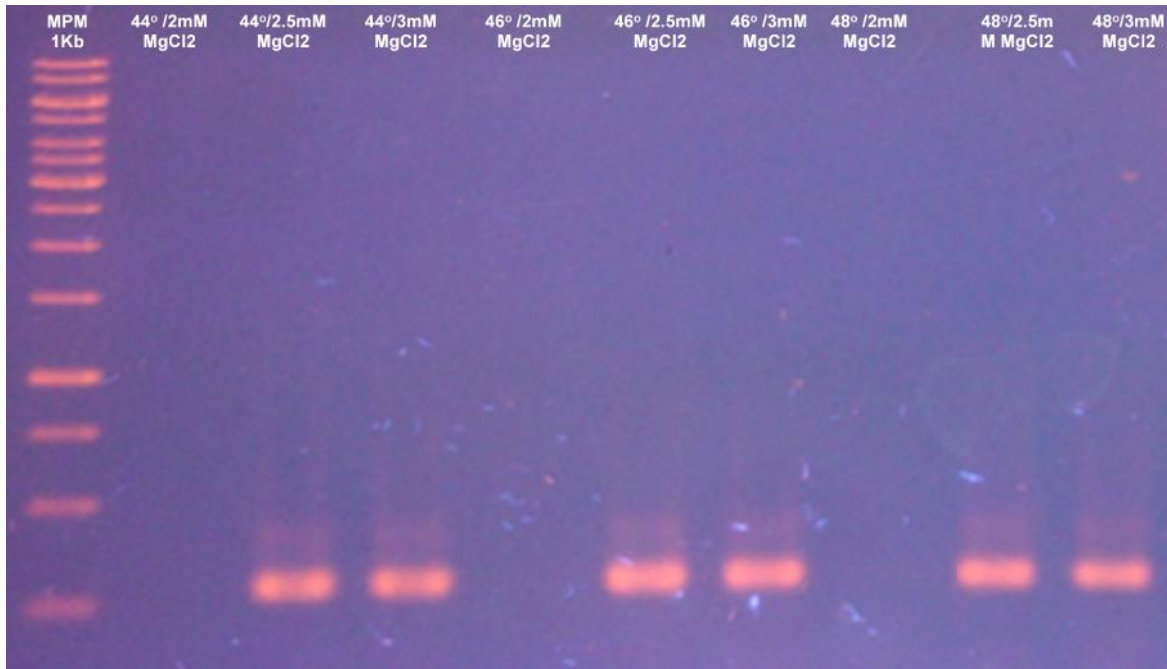
33. Abbitt B, Craig TM, Jones LP, Huey RL, Eugster AK. 1993. Protozoal abortion in a herd of cattle concurrently infected with *Hammondia pardalis*. J Am Vet Med Assoc. 203:444-448.



34. Delgado GR, Quintero CJ y Luna de 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. 1995. 74-78. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C. Torreón, Coahuila, México (1995).
35. Morales SE, Ramírez LJ, Trigo TF, Ibarra VF, Puente CE, Santa Cruz M. 1997. Descripción de un caso de aborto bovino asociado a infección por *Neospora* sp en México Vet. Méx; 28:353-357.
36. Morales SE, Trigo FJ, Ibarra F, Puente E, Santacruz M. 2001. Neosporosis in Mexican dairy herds: lesions and immunohistochemical detection of *Neospora caninum* in fetuses. J. Comp. Pathol. 125:58-63.
37. Morales SE, Trigo FJ, Ibarra F, Puente E, Santacruz M. 2001. Seroprevalence study of bovine neosporosis in Mexico. J. Vet. Diagn. Invest. 13:413-415.
38. Sánchez GF, Morales SE, Martínez MJJ, Trigo TFJ. 2003. Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico Can. J. Vet. Res. 67:142-147.
39. Cruz-Vázquez C, Medina-Esparza L, Marentes A, Morales-Salinas E, García-Vázquez Z. 2008. Seroepidemiological study of *Neospora caninum* infection in dogs found in dairy farms and urban areas of Aguascalientes, Mexico. Vet. Parasitol., 157:139-143

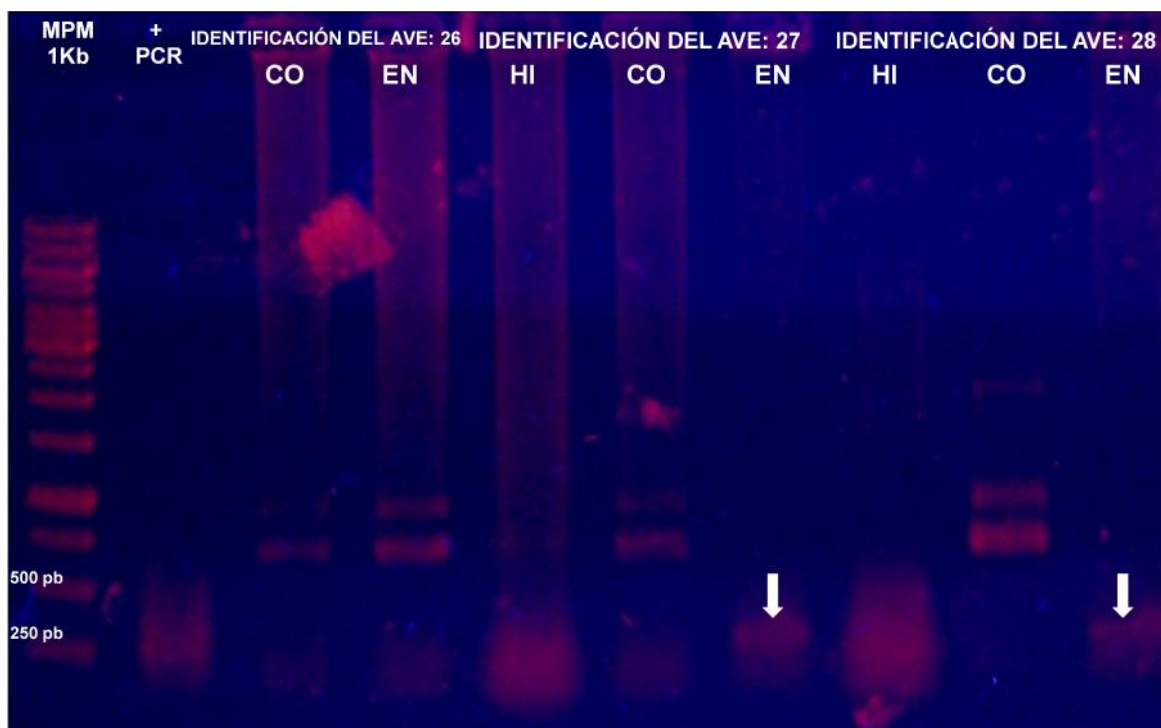
40. García-Vázquez Z, Rosario-Cruz R, Ramos-Aragón A, Cruz-Vázquez C, Mapes-Sánchez G. 2015. *Neospora caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. *Vet. Parasitol.* 134: 61–65.
41. Bartels CJ, Wouda W, Schukken YH, 1999. Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in The Netherlands (1995 to 1997). *Theriogenology.* 52: 247–257.
42. Otranto D, Llazarri A, Testini G, Traversa D, di Regalbono AF, Badan M, Capelli G. 2003. Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. *Vet. Parasitol.* 118: 7–18.

Figura 1. PCR de gradiente para estandarizar el protocolo de PCR de *Neospora caninum* utilizando 44<sup>o</sup>, 46<sup>o</sup> y 48<sup>o</sup>C con diferentes concentraciones de magnesio (2, 2.5 y 3 mM).



MPM.-Marcador de peso molecular de 1 kilobase. Los iniciadores PN1 y PN2 amplifican un segmento de 279 pb aproximadamente del ITS-1.

Figura 2. PCR utilizando los iniciadores PN1 y PN2 mostrando amplificación de 279 pares de bases de la región ITS1 de *Neospora caninum* en el encéfalo de dos aves.



MPM.-Marcador de peso molecular de 1 kilobase, +PCR.- Control positivo del PCR utilizando DNA de vacuna de taquizoitos de *Neospora caninum*, HI.- Hígado, CO.- Corazón, EN.- Encéfalo.